



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**RODNEI DENNIS ROSSONI**

**INTERAÇÕES ENTRE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Candida*  
NA CANDIDOSE EXPERIMENTAL EM MODELOS DE  
INVERTEBRADOS E VERTEBRADOS**

2013

**RODNEI DENNIS ROSSONI**

**INTERAÇÕES ENTRE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Candida* NA  
CANDIDOSE EXPERIMENTAL EM MODELOS DE INVERTEBRADOS E  
VERTEBRADOS**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2013

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos Campos:  
ICT/UNESP; 2013.

R737i Rossoni, Rodnei Dennis  
Interações entre diferentes espécies de Candida na candidose experimental em  
modelos de invertebrados e vertebrados / Rodnei Dennis Rossoni. - São José dos  
Campos : [s.n.], 2013.  
112 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Instituto de Ciência e Tecnologia  
de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2013.  
Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira.

1. Candida. 2. Candidíase bucal. 3. Interações hospedeiro-patógeno 4.  
Invertebrados. 5. Modelos animais. I. Junqueira, Juliana Campos. II. Instituto de  
Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista.  
III. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ  
Estadual Paulista. V. Título

tD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do  
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por  
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 25 de Setembro de 2013.

E-mail: rodnei.rossoni@fosjc.unesp.br

Assinatura :

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira** (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos  
UNESP – Univ Estadual Paulista

**Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge**

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos  
UNESP – Univ Estadual Paulista

**Prof.Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**

Faculdade de Odontologia de Araraquara  
UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 16 de dezembro de 2013.

## DEDICATÓRIA

*À Deus, acima de tudo e de todos, pela sua presença e proteção constante em minha vida desde a infância e até o dia de hoje.*

*À minha avó por ser meu porto seguro e pelas incansáveis horas de dedicação e amor durante todas as etapas de minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*À minha querida orientadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira, primeiramente pela oportunidade de ter sido seu orientado por 7 anos, por apostar na minha capacidade como pesquisador, desafiar meus limites e por oferecer todos os meios necessários para o desenvolvimento desse trabalho. Por sua paciência, dedicação, amizade, por seu exemplo como pessoa e profissional, meu eterno agradecimento. Com certeza todo conhecimento que adquiri é fruto de uma excelente orientação.*

*Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge por quem tenho grande respeito e admiração, por seus ensinamentos tão preciosos, pelas palavras de incentivo e oportunidades que me proporcionou durante todo este período no laboratório, meu eterno agradecimento.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara.*

*Ao Programa de Pós- graduação em Biopatologia Bucal, coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira e vice-coordenadora Profa. Dra. Ana Lia Anbinder, pelo apoio constante para a realização desse trabalho.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo de mestrado (processo 2011/151924-0), pela bolsa de Iniciação Científica concedida a aluna Jéssica Diane dos Santos (processo 2011/10071-7) e pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou aquisição dos materiais necessários para a realização deste projeto (processo 2012/02184-9).*

*Ao Carlos Guedes, pela paciência em nos ajudar quanto aos processos FAPESP.*

*À todos os professores pelo convívio durante a realização dos créditos pela amizade, apoio e ensinamentos.*

*À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira com sorriso sempre doce, pronta para responder e ajudar em qualquer questionamento ou dúvida.*

*À Profa Dra. Ana Lia Anbinder, pela sua disponibilidade e auxílio nas fotografias dos cortes histológicos.*

*À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA de Juiz de Fora, na pessoa da pesquisadora Profa. Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata, pelo envio das lagartas sem as quais este trabalho não teria êxito.*

*Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Sérgio Giovanni Alves e Domingos Gonçalves Pontes, que foram essenciais para qualidade da pesquisa.*

*Ao técnico do laboratório de patologia Walter Cruz, pelo cuidado e auxílio na preparação dos cortes histológicos.*

*Aos secretários da Seção da Pós Graduação, Rosemary de Fatima Salgado, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, Erena Michie Hasegawa e Ivan Oliveira Damasceno pela amizade e ajuda durante este tempo.*

*À todos os funcionários da biblioteca, em especial Renata Aparecida de Oliveira Couto e Silvana Alvarez, pelo auxílio na finalização do trabalho.*

*Às amigas, Simone Furgeri Godinho Vilela e Júnia Oliveira Barbosa, pelos momentos de descontração, amizade e ajuda imprescindível para conclusão dos experimentos.*

*À “minha” aluna de Iniciação Científica, Jéssica Diane dos Santos, pela dedicação, disponibilidade, amizade e auxílio durante toda fase experimental. Sem você, seria impossível realizar todo esse trabalho.*

*À minha amiga, Cristiane Aparecida Pereira Correia, por todos os anos de amizade, descontração e apoio. Muito obrigado por tudo.*

*À minha amiga, Patrícia Pimentel, por torna-se alguém tão especial em tão pouco tempo de amizade e pelas eternas discussões sobre os resultados no decorrer desse trabalho em nossos cafés da tarde.*

*Às amigas da Patologia, Gabriela Esteves de Campos, Gabriela Lima, Renata Moraes, Renata Pilli Jóias, Miriane Machado, pela amizade e convívio fraterno durante todo o decorrer do curso.*

*À todos os colegas do laboratório, Ana Carolina Chipoletti, Adeline Lacerda Jorjão, Mírian Marcolan, Jonatas Rafael de Oliveira, Fernanda Freire, Anna Carolina Borges Pereira da Costa, Nádia Domingues, Lírian Figueiredo, Michele Peneluppi, Fernanda Tomé, Lilian Maekawa, Rafaella Braga, Tamara Carneiro, Felipe Camargo, Janaína Araújo Alvarenga, Talita Tavares e aos demais colegas pelo companheirismo e boa convivência que tivemos durante o curso.*

*Ao técnico do biotério, Antonio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcellos pelos ensinamentos e paciência.*

*Aos queridos amigos de casa, Evelyn Luzia de Souza Santos, Felipe Eduardo de Oliveira e Tânia Mara da Silva por tornarem meus dias mais floridos. Vocês são pessoas especiais e que levarei pela vida afora a amizade e os princípios de respeito e irmandade.*

*Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a concretização deste trabalho, estimulando-me intelectual e emocionalmente.*

***“Lembraí do tempo que levastes para chegar aqui,  
de todas as vitórias e lágrimas,  
de todos os sorrisos e fracassos.***

***Lembraí dos sonhos realizados,  
das frustrações, das decepções colhidas.***

***Lembraí de tudo o que passou.  
Ganhastes mais força,  
mais sabedoria e finalmente podes olhar para o que há diante de ti  
e perceber  
que apenas chegastes ao começo.  
– Seja bem vindo ao começo!”***

**Augusto Branco**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	21
2.2 Interação microbiana.....	25
2.3 <i>Galleria mellonella</i> .....	30
2.4 Candidose experimental.....	36
3 PROPOSIÇÃO.....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Comitê de ética.....	43
4.2 Micro-organismos.....	43
4.3 Estudo das interações microbianas em biofilme formado <i>in vitro</i> .....	44
4.3.1 Preparo da suspensão de <i>Candida</i> .....	44
4.3.2 Formação do biofilme <i>in vitro</i> .....	45
4.3.3 Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) do biofilme.....	45
4.4 Estudo das interações microbianas em modelo de <i>Galleria mellonella</i> .....	46
4.4.1 Infecção de <i>G. mellonella</i> por <i>Candida</i> .....	46
4.4.2 Análise de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> .....	47
4.4.3 Contagem de UFC/mL de <i>Candida</i> na hemolinfa de <i>G. mellonella</i> .....	48

<b>4.5 Estudo das interações microbianas em modelo de camundongo imunossuprimido</b> .....	48
4.5.1 Animais experimentais.....	48
4.5.2 Verificação de colonização natural por <i>Candida</i> spp. na cavidade bucal dos camundongos.....	49
4.5.3 Imunossupressão e administração de tetraciclina.....	50
4.5.4 Preparo da suspensão de <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. glabrata</i> .....	50
4.5.5 Inoculação da suspensão de <i>Candida</i> na cavidade bucal dos camundongos.....	51
4.5.6 Recuperação de <i>Candida</i> da cavidade bucal dos camundongos.....	51
4.5.7 Eutanásia dos animais.....	52
4.5.8 Análise macroscópica de <i>Candida</i> no dorso da língua.....	52
4.5.9 Análise microscópica de <i>Candida</i> no dorso da língua.....	52
<b>4.6 Análise estatística</b> .....	53
<b>5 RESULTADOS</b> .....	54
<b>5.1 Estudo das interações microbianas em biofilme formado <i>in vitro</i></b> .....	54
<b>5.2 Estudo das interações microbianas em modelo de <i>G. mellonella</i></b> .....	58
5.2.1 Análise de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> .....	58
5.2.2 Contagem de UFC/mL de <i>Candida</i> na hemolinfa de <i>G. mellonella</i> .....	62
<b>5.3 Estudo das interações microbianas em modelo de camundongo imunossuprimido</b> .....	68
5.3.1 Recuperação de <i>Candida</i> da cavidade bucal dos camundongos.....	68
5.3.2 Análise macroscópica de <i>Candida</i> no dorso da língua.....	73
5.3.3 Análise microscópica de <i>Candida</i> no dorso da língua.....	77

<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>112</b>

Rossoni RD. Interações entre diferentes espécies de *Candida* na candidose experimental em modelos de invertebrados e vertebrados [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2013.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* e *in vivo* as interações entre as diferentes espécies de *Candida* por meio da formação de biofilme em placas de 96 poços, indução de candidose experimental em modelo de *Galleria mellonella* e de camundongos imunossuprimidos. Foram estudadas as cepas padrão das seguintes espécies: *C. albicans* (ATCC 18804), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. glabrata* (ATCC 90030). A partir de cada espécie, foram formados biofilmes monotípicos e heterotípicos no fundo da placa de 96 poços por 48 h. A seguir, a quantidade de biofilme formado foi analisada pela determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). *G. mellonella* foi inoculada com suspensões homotípicas e heterotípicas de *Candida* ( $10^5$  células/mL) e incubadas a 37°C. Durante 5 dias, o número de lagartas mortas foi avaliado diariamente para análise da curva de sobrevivência. Em outro experimento, após 0, 2, 4, 8, 12 e 24 h da infecção por *Candida*, a hemolinfa das lagartas foi extraída para contagem das células fúngicas (UFC/mL). Para a indução da candidose bucal em camundongos, os animais foram inoculados com suspensões microbianas homotípicas ou heterotípicas contendo  $10^8$  células/mL. Após 48 h da última inoculação, amostras do dorso da língua foram coletadas e semeadas em ágar cromogênico HiCrome para contagem de UFC/mL recuperadas da cavidade bucal. Em seguida, os animais foram eutanasiados e as línguas retiradas para análise macroscópica e microscópica. A análise dos dados de UFC/mL dos biofilmes *in vitro*, de *Candida* na hemolinfa de *G. mellonella* e da recuperação dos camundongos foi feita por Análise de Variância, Teste de Tukey ou *t* de Student. A análise da curva de sobrevivência foi realizada utilizando o teste Log-rank (Mantel-Cox). Para avaliação dos escores obtidos na análise macroscópica e histológica foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney ( $p \leq 0,05$ ). Os resultados dos biofilmes formados *in vitro* demonstraram um menor número de UFC/mL de *C. albicans* nos biofilmes heterotípicos quando comparado ao biofilme monotípico. As lagartas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* apresentaram 100% de mortalidade após 18 h da infecção, enquanto que os grupos interação de *C. albicans* - *C. krusei*

e *C. albicans* - *C. glabrata* alcançaram 100% de mortalidade, respectivamente, após 96 e 72 h da infecção. Além disso, o número de UFC/mL de *C. albicans* na hemolinfa das lagartas com candidose experimental foi menor nos grupos de interação em relação ao grupo controle. A UFC/mL de *C. albicans* recuperada dos camundongos foi maior para o grupo inoculado com suspensão monotípica (5,75 log) em comparação com as infecções mistas com *C. glabrata* (5,46 log,  $P=0,079$ ) ou *C. krusei* (5,32 log,  $P=0,012$ ). Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos na análise macroscópica ( $P=0,087$ ). Entretanto, na análise microscópica, o grupo monotípico de *C. albicans* também obteve maior quantidade de alterações epiteliais ( $P=0,0013$ ) e hifas ( $P=0,0009$ ) em relação aos grupos de interação. Conclui-se que, tanto *in vitro* como *in vivo*, a infecção monotípica por *C. albicans* foi mais intensa que as infecções mistas com espécies não *albicans*, sugerindo uma relação de competição entre as espécies durante o estabelecimento da infecção.

Palavras-chave: *Candida*. Candidíase bucal. Interações Hospedeiro-Patógeno. Invertebrados. Modelos animais.

Rossoni RD. Interactions between Candida species in the experimental candidiasis in invertebrate and vertebrate models [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* interactions between different Candida species through the formation of biofilms in 96-well plates, induction of experimental candidiasis in Galleria mellonella model and immunosuppressed mice. We studied the standard strains of the following species: C. albicans (ATCC 18804), C. krusei (ATCC 6258) and C. glabrata (ATCC 90030). Monotypic biofilms of each species and heterotypic biofilms were performed on the bottom of 96-well plate for 48 h. Then, the amount of biofilm was analyzed by determining the number of colony forming units (CFU/mL). The larvae of G. mellonella were inoculated with homotypic and heterotypic suspensions of Candida ( $10^5$  cells/mL) and incubated at 37°C. For 5 days, the number of dead larvae was assessed daily for survival curve analysis. In another experiment, after 0, 2, 4, 8, 12 and 24 h of infection with Candida, hemolymph of worms was extracted for counting the fungal cells (CFU/mL). For induction of oral candidiasis in mice, the animals were inoculated with homotypic or heterotypic microbial suspensions containing  $10^8$  cells/mL. After 48 h of the last inoculation, samples of the tongue were collected and seed in HiCrome chromogenic agar for counting of CFU/mL recovered from the oral cavity. Then, the animals were euthanized and their tongues removed for macroscopic and microscopic analysis. The analysis of Candida biofilms *in vitro* CFU/mL, the hemolymph of G. mellonella and recovery of mice were made by ANOVA, Tukey test or Student's t test. The analysis of the survival curve was performed using GraphPad Prism using the Log-rank test (Mantel - Cox). Kruskal-Wallis or Mann-Whitney were applied for evaluation scores of macroscopic and histological analysis ( $p \leq 0,05$ ). The results of biofilms *in vitro* have demonstrated a lower number of CFU/mL of C. albicans biofilms in heterotypic biofilm compared to monotypic. In the G. mellonella model, 100% of the larvae died within 18 h of infection with C. albicans. However, when G. mellonella larvae were infected by C. albicans and C. krusei, it was necessary 96 h to achieve 100% of mortality ( $p=0.0001$ ). In addition, the number of CFU/mL of C. albicans in the hemolymph of caterpillars with experimental candidiasis was lower in the interacting groups compared to the control group. The CFU/mL of C.

*albicans* recovered from mice was higher in the group inoculated with monotypic suspension (5.75 log) when compared with mixed infections with *C. glabrata* (5.46 log,  $P = 0.079$ ) or *C. krusei* (5.32 log,  $P = 0.012$ ). It was not possible to observe a statistically significant difference between groups in the macroscopic analysis ( $P = 0.087$ ). However, microscopic analysis, the group of monotypic *C. albicans* also had higher amounts of epithelial changes ( $P = 0.0013$ ) and hyphae ( $P = 0.0009$ ) compared to interacting groups. It is concluded that, both *in vitro* and *in vivo* infection by *C. albicans* was more intense than mixed infections with non-*albicans* species, suggesting an interaction of competition between species during the establishment of infection.

Keywords: *Candida*. Oral Candidiasis. Host-Pathogen Interactions. Invertebrates. Animal models.

## 1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal humana é considerada um ambiente único que oferece uma variedade de nichos ecológicos para a colonização microbiana (Hofling et al., 2011). O gênero *Candida* é composto por mais de 150 espécies de leveduras, sendo que muitas são encontradas no organismo humano habitando diferentes superfícies epiteliais, como a mucosa bucal. Essas espécies colonizam o homem como micro-organismos comensais, podendo tornar-se patogênicas em indivíduos imunossuprimidos ou que apresentam outros fatores predisponentes, como uso de antibióticos, próteses, aparelhos ortodônticos, entre outros (William, Lewis, 2011).

Nas últimas décadas houve um aumento significativo na incidência de candidoses, que reflete as mudanças ocorridas nas práticas médicas, como maior utilização de procedimentos invasivos, amplo uso de terapias imunossupressoras e anti-neoplásicas, assim como a terapia prolongada com antimicrobianos de amplo espectro (de Repentigny, 2004). O advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi também um fator determinante para o aumento da candidose bucal, uma vez que mais de 80% dos pacientes com AIDS manifestam candidose orofaríngea (Samaranayake Y, Samaranayake L, 2001; Gaitán-Cepeda et al., 2005; Samaranayake L et al., 2009; Rautemaa, Ramage, 2011).

As infecções fúngicas na cavidade bucal são causadas principalmente pela espécie *Candida albicans*, que constitui cerca de 50 a 70% das leveduras isoladas (Souza et al., 2010). Embora *C. albicans* ainda seja a espécie mais prevalente, o isolamento de espécies não *albicans* como: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* e *C. lusitaniae* está aumentando

progressivamente (Thompson et al., 2010; Zomorodian et al., 2011).

Junqueira et al. (2012c) avaliaram a prevalência de leveduras do gênero *Candida* na saliva e nas lesões de candidose orofaríngea de pacientes portadores do HIV atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (São Paulo), os autores verificaram que 42% dos pacientes apresentavam colonização ou infecção mista por diferentes espécies de *Candida*, sendo as associações mais frequentes formadas por *C. albicans* com *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

As diferentes espécies de *Candida* são capazes de se organizar em biofilmes na cavidade bucal e desenvolver relações ecológicas entre si. Os biofilmes são compostos por blastoconídios e pseudo-hifas incorporados em uma matriz extracelular e possuem características fenotípicas diferentes em relação às culturas planctônicas, tais como suscetibilidade reduzida aos antifúngicos e proteção contra o sistema imunológico (Martinez, Fries, 2010; Tobudic et al., 2012; Costa et al., 2012a). Atualmente, estimam-se que cerca de 65% de todas as infecções humanas estejam associadas com a formação de biofilme microbiano nas superfícies dos tecidos, órgãos ou dispositivos médicos (Ramage et al., 2009).

Nas duas últimas décadas, a maioria das pesquisas estavam focadas no estudo das propriedades estruturais e fenotípicas dos biofilmes formados por uma única espécie microbiana. Entretanto, os pesquisadores sentiram a necessidade de estudos voltados para as interações entre as múltiplas espécies encontradas nos ecossistemas, como as que existem entre bactérias e fungos, e entre espécies distintas de micro-organismos do mesmo gênero. Em biofilmes mistos, as interações entre as diferentes espécies podem ser neutra, benéfica ou de natureza competitiva e, portanto, a presença de uma segunda espécie pode influenciar na formação do biofilme da primeira. As interações entre as diferentes espécies são um fator determinante para a composição do biofilme de espécies mistas (van Merode et al., 2007; Mitri et al., 2011).

O grande interesse no estudo das interações de espécies microbianas em biofilmes mistos é devido à constatação de que os modelos de monoespécies não representam a realidade das relações entre multiespécies de comunidades de bactérias e fungos encontradas no corpo humano (Thein et al., 2009). Apesar da abundância de interações microbianas na natureza, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que determinam estas interações e sua importância para a saúde humana (Peleg et al., 2010).

A versatilidade dos mecanismos de patogenicidade das diferentes espécies de *Candida* e a crescente resistência aos medicamentos antifúngicos indicam a importância do desenvolvimento de modelos experimentais com animais vertebrados e invertebrados para caracterizar essas interações e compreender a sua importância na doença (Chamilos et al., 2007; Fuchs et al., 2010).

Um grande número de modelos invertebrados, incluindo *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Dictyostelium discoideum*, foram desenvolvidos e são utilizados para estudo de fungos patogênicos. Estes modelos de invertebrados oferecem uma série de vantagens em relação aos modelos vertebrados de ratos e camundongos, como o menor tamanho do animal, a redução de custo na criação, rapidez nos resultados e menor impacto nos comitês de ética em pesquisa. Além disso, os modelos de invertebrados podem ser utilizados para estudos em grande escala, servindo como triagem para os estudos em vertebrados (Mylonakis, 2008).

A lagarta da cera de abelha *Galleria mellonella* tem sido usada com sucesso para avaliar a patogenicidade de isolados de *Candida*, apresentando resultados comparáveis aos obtidos com modelos de mamíferos (Mylonakis, 2008). *G. mellonella* é um modelo experimental confiável e comprovado para estudos de patogênese e imunidade inata, pois ela apresenta em sua hemolinfa seis tipos de hemócitos (pró-hemócitos, coagulócitos, esferulócitos, oenócitos, plasmócitos e

granulócitos), que desempenham um papel importante na interação patógeno-hospedeiro (Chamilos et al., 2007; Mylonakis, 2008; Vogel et al., 2011).

Entre os modelos de invertebrados, *G. mellonella* apresenta várias vantagens que são exclusivas destes lepidópteros. As lagartas podem ser mantidas a uma temperatura entre 25 a 37°C, aproximando-se das condições de temperatura em que os fungos são encontrados nos hospedeiros. Além disso, são facilmente inoculadas por *Candida*, permitindo uma inoculação precisa/padronizada de células fúngicas na sua hemolinfa, ao contrário do modelo de *C. elegans*, no qual a inoculação do micro-organismo é feita por ingestão (Fuchs et al., 2010).

Para o estudo das candidoses bucais, os modelos de animais vertebrados são extremamente importantes para avaliação da etiopatologia, diagnóstico e desenvolvimento da doença (Samaranayake Y, Samaranayake L, 2001), uma vez que estes animais reproduzem condições próximas do ambiente bucal humano, como fluxo salivar, variações de pH, presença de dentes, características da mucosa e ação do sistema imunológico (Kömerik et al., 2003).

O camundongo como modelo de animal experimental tem sido útil para o desenvolvimento de candidose bucal, pois não possui *Candida* spp. como constituinte da microbiota, são facilmente obtidos em grande número e sua manutenção é de baixo custo em relação aos demais vertebrados (Samaranayake Y, Samaranayake L, 2001; Totti et al., 2002; Takakura et al., 2003).

Takakura et al. (2003) desenvolveram um modelo animal para candidose pseudomembranosa utilizando camundongos imunossuprimidos. A indução de candidose foi realizada pela administração de cloreto de tetraciclina a 0,83 mg/mL na água de beber e imunossupressão com injeção de prednisolona na dose de 100 mg/Kg por peso corporal. Os resultados indicaram que a combinação da tetraciclina com o corticosteróide aumentou a colonização de *Candida* na cavidade

bucal e levaram ao desenvolvimento de candidose pseudomembranosa, sugerindo que esse modelo experimental constitui uma importante ferramenta para o estudo da patogênese da candidose bucal e da atividade terapêutica de novos antimicrobianos.

Devido à alta incidência de lesões de candidose em pacientes imunocomprometidos e a emergência das espécies não *albicans*, que são freqüentemente isoladas em associação com *C. albicans* nas infecções mistas, torna-se necessário o desenvolvimento de modelos de estudo *in vitro* e *in vivo* para caracterizar as interações entre as espécies de *Candida*. Modelos de estudo em animais invertebrados e vertebrados podem ser úteis para avaliar a interação das espécies de *Candida* na indução da candidose experimental e, conseqüentemente, no desenvolvimento da doença. Além disso, o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais os micro-organismos competem em um mesmo meio pode direcionar o desenvolvimento de novos tratamentos para essas infecções fúngicas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leveduras do gênero *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* são os patógenos fúngicos mais comumente encontrados na cavidade bucal e no trato genito-urinário dos seres humanos e são isoladas de aproximadamente 62% de indivíduos saudáveis. Portanto, as candidoses possuem grande importância nas áreas médica-odontológica e sócio-econômica. A compreensão entre a interação das espécies de *Candida* com o hospedeiro é fundamental e um dos maiores desafios da medicina, pois permitirá entender os mecanismos pelos quais estes micro-organismos colonizam e causam doença nos seres humanos (Naglik et al., 2004; Salerno et al., 2011).

Para a maioria dos indivíduos, as leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota bucal e causam apenas infecções oportunistas (Samaranayake L et al., 2009; Ghannoum et al., 2010). Nos indivíduos imunocompetentes, o crescimento dessas leveduras residentes é suprimido por mecanismos de defesa específicos e não específicos da saliva e da mucosa bucal, assim como ocorre também uma inibição através da competição entre as espécies de outros micro-organismos colonizadores da cavidade bucal (Rautemaa, Ramage, 2011).

Como infecção oportunista, a candidose bucal ocorre em decorrência da virulência do micro-organismo e da baixa capacidade do hospedeiro em prevenir a colonização e/ou invasão microbiana, que pode ser facilitado por fatores de riscos locais e sistêmicos como alteração da microbiota bucal, higiene bucal deficiente, xerostomia, radioterapia,

deficiências primárias ou secundárias da imunidade humoral ou mediada por células, senilidade, deficiência nutricional, doenças da mucosa bucal, utilização de antibióticos de amplo espectro, refluxo gastroesofágico, uso de corticosteróides, permanência prolongada em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), cirurgias invasivas, infecção por HIV, diabetes, doenças degenerativas e/ou neoplásicas, transplante de medula óssea, entre outros fatores que acometem pacientes imunodebilitados e que podem resultar em transição dessas leveduras da fase comensal para a patogênica (al-Hashimi et al., 2007; Soysa et al., 2008; Samaranayake L et al., 2009; Vazquez, 2010).

As manifestações clínicas das infecções por *Candida* na cavidade bucal variam de uma candidose pseudomembranosa aguda, caracterizada por placas brancas sobre a mucosa inflamada e vermelha até lesões eritoplásticas e leucoplásticas erosivas (Samaranayake L et al., 2009). Os sintomas clínicos são de queimação e dor localizada, que são resultados da degradação superficial do epitélio da mucosa bucal. Além disso, a extensa colonização dessas leveduras pode desempenhar um papel fundamental em doenças periodontais progressivas, bem como na progressão da cárie dentária (Jenkinson, Lamont, 2005; Shen et al., 2005; Rautemaa, Ramage, 2011).

Nos fungos do gênero *Candida*, a transição do estado de comensalismo para o de patogenicidade pode ser atribuída à expressão seletiva de vários fatores de virulência, que agem de forma sinérgica, sob condições predisponentes favoráveis. Assim, o tipo, o estágio e o sítio da infecção, além da natureza da resposta imune, fazem com que a levedura expresse alguns dos seus fatores de virulência. (Hube, Naglik, 2001; Pomarico et al., 2009).

Diversos fatores de virulência contribuem para a patogenicidade, colonização e infecção dos tecidos por *Candida*, incluindo aderência em células epiteliais e aos biomateriais, produção de enzimas como as proteinases, fosfolipases e hemolisinas e capacidade em formar

tubos germinativos e hifas (Calderone, Fonzi, 2001; Akpan, Morgan, 2002; Noumi et al., 2010). A atividade enzimática desempenha um papel fundamental na capacidade deste fungo de se estabelecer como um colonizador ou micro-organismo infeccioso (Wu et al., 1996; Ghannoum, 2000).

Desde a caracterização da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) na década de oitenta, houve um acréscimo significativo no número de pacientes imunossuprimidos com as mais variadas expressões clínicas associadas. Uma delas, a candidose bucal, principalmente a orofaríngea, tornou-se a infecção fúngica mais comumente diagnosticada e relacionada às infecções bucais nesses pacientes, assumindo posição de suma importância nos estudos associados a esta síndrome (Egusa et al., 2008).

Luque et al. (2009) estudaram a prevalência de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de 209 indivíduos, sendo que 101 eram HIV-positivos e 108 HIV-negativos e analisaram a sensibilidade das espécies ao itraconazol, fluconazol e anfotericina B. Nesse trabalho, os autores verificaram que a colonização bucal desta levedura em pacientes HIV-positivos foi maior (72,3%) em relação ao grupo HIV-negativo (39,8%). Além disso, verificou-se que os pacientes portadores desta síndrome apresentavam maior número de cepas de *Candida* resistentes aos antifúngicos azóis em relação aos pacientes saudáveis.

Hamza et al. (2008) coletaram amostras de 292 pacientes infectados pelo HIV com candidose orofaríngea primária e recorrente. *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada (84,5%), seguida por *C. glabrata* (6,8%) e *C. krusei* (3,4%). Não foi observada diferença significativa na distribuição das espécies entre os pacientes com candidose primária e recorrente. Entretanto, os isolados dos pacientes com candidose recorrente foram menos sensíveis aos antifúngicos azóis quando comparados aos isolados das lesões de candidose primária.

Embora, *C. albicans* seja a espécie predominantemente isolada das lesões de candidose, a frequência de isolamento das espécies não *albicans* está aumentando progressivamente. Maninder e Usha (2008) avaliaram a prevalência, caracterização e a suscetibilidade antifúngica de espécies de *Candida* na candidose orofaríngea em pacientes HIV e verificaram que dos 100 pacientes portadores do HIV, 61 eram portadores de lesões orofaríngeas por *Candida* spp. e desse grupo 29,50% eram colonizados por espécies não *albicans* e desse total 22,2% eram resistentes ao fluconazol.

O aumento das espécies de *Candida* não *albicans* na candidose humana pode ser atribuído, em parte, aos avanços nos métodos de diagnóstico, como o uso de meios de culturas primários com capacidade de diferenciação entre espécies de *Candida* e a introdução de técnicas moleculares como rotina para o diagnóstico. Outros fatores têm sido implicados no aumento da prevalência dessas espécies de *Candida*, incluindo a introdução e o amplo uso de determinadas práticas médicas, como a terapia imunossupressiva, o uso de antibióticos de amplo espectro e o aumento do número de procedimentos cirúrgicos invasivos. Além disso, esse aumento pode ser um reflexo da seleção de espécies na presença de determinados antifúngicos, devido ao alto nível de resistência demonstrado pelas espécies não *albicans* (Badiee et al., 2010; Zomorodian et al., 2011; Silva et al., 2011b).

Mais de 90% das infecções invasivas por *Candida* são atribuídos a cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. No entanto, a lista de novas espécies de *Candida* isoladas das mais variadas formas continua a crescer a cada ano. Entre as espécies não *albicans*, *C. glabrata* tem emergido como um importante patógeno oportunista em todo o mundo. É a segunda espécie de *Candida* mais isolada como parte da microbiota normal e seu papel como patógeno só foi reconhecido nas últimas décadas. Infecção por *C. glabrata* é visto com mais frequência em idosos e é comparativamente

rara em recém-nascidos e crianças. Embora os fatores de risco para candidemia por *C. glabrata* parecem ser os mesmos que para candidemia em geral, esta espécie em particular emergiu proeminente em pacientes com doenças malignas hematológicas (Malani et al., 2005; Giri, Kindo, 2012).

Outra importante espécie desse gênero é *C. krusei*, ela é responsável por 4% das infecções sistêmicas causadas por espécies não *albicans* de *Candida*, e tem maior prevalência em pacientes com doenças malignas hematológicas e transplantados de medula óssea. Uma das principais razões para a emergência dessa espécie é sua resistência intrínseca ao fluconazol no qual é amplamente utilizado em pacientes hospitalizados (Pfaller, Diekema, 2007; Giri, Kindo, 2012).

## **2.2 Interação Microbiana**

Os micro-organismos raramente existem na forma isolada na natureza, quase na totalidade, eles são encontrados crescendo em comunidades complexas denominadas biofilmes polimicrobianos, estes são aderidos a uma superfície abiótica ou biótica. Biofilme pode ser definido como um conjunto variado de micro-organismos (fungos, bactérias e vírus) aderidos a uma superfície e revestidos por uma matriz extracelular, geralmente constituída por polissacarídeos. O trato gastrointestinal e a cavidade bucal são os dois sítios anatômicos do corpo humano que possuem maior diversidade microbiana, onde 600 a 1.000 espécies de bactérias foram identificadas como colonizadoras residentes. Devido à grande diversidade e concentração de micro-organismos presentes colonizando o mesmo hábitat, interações entre as espécies se desenvolveram ao longo dos anos. Alguns micro-organismos estabeleceram relações sinérgicas para facilitar a convivência em

superfícies epiteliais e utilizar eficientemente subprodutos metabólicos de outras espécies, enquanto outros têm desenvolvido relações competitivas ou antagônicas durante a colonização. Estas relações são expressas pelo contato célula-célula através de *quorum sensing* levando essa comunidade microbiana a expressar diversos fenótipos de virulência, imunomodulação, ou a combinação destes (Peleg et al., 2010; Peters et al., 2012).

A estrutura do biofilme é constituída por uma estratificação das populações microbianas espacialmente organizadas, onde se desenvolvem várias relações de cooperação entre as diferentes espécies (Gilbert et al., 1997; Peleg et al., 2010). Existe atualmente um grande interesse no estudo das interações microbianas em biofilmes mistos, devido à constatação de que os modelos de monoespécies não representam a realidade das relações entre multiespécies de comunidades de bactérias e fungos encontradas nos estados de saúde e doença (Thein et al., 2009).

As interações celulares mutuamente benéficas em biofilmes mistos ocorrem quando as diferentes espécies fornecem proteção uma para a outra contra a resposta imune ou a ação de agentes antimicrobianos. As relações antagônicas entre bactérias e fungos têm sido associadas com a secreção de moléculas antifúngicas no ambiente local, pela liberação de toxinas diretamente na célula fúngica ou pelo esgotamento de nutrientes, o que leva a uma redução de fungos no local. Outro mecanismo da interação fúngica-bacteriana é a modificação do ambiente, como a mudança no pH, que pode influenciar na formação de hifas de determinados fungos (Peleg et al., 2010).

A maioria dos estudos sobre interações microbianas estão focados na relação de bactérias e fungos. Entretanto, estudos na literatura demonstram que infecções por *Candida* podem ser causadas por biofilmes formados pelas diferentes espécies desse gênero. A interação entre diferentes espécies de *Candida* em culturas planctônicas

e em biofilme foi demonstrado pela primeira vez na literatura por Kirkpatrick et al. (2000) utilizando *C. albicans* e *C. dubliniensis*. O estudo demonstrou que essas duas espécies de *Candida* quando associadas, tinham um menor crescimento, possivelmente devido à competição por nutrientes e/ou pelos metabólitos tóxicos gerados pelas espécies.

Thein et al. (2007) estudaram a interação *in vitro* entre *C. albicans* e *C. krusei* em biofilmes formados em superfícies acrílicas de prótese total. Os autores encontram nos biofilmes mistos baixa quantidade de hifas e leveduras (ambos *C. albicans* e *C. krusei*) em relação aos biofilmes formados por única uma espécie, sugerindo uma competição. Embora os mecanismos exatos das interações entre as espécies de *Candida* sejam desconhecidos, a competição pelos sítios de adesão, pelos nutrientes e as diferenças nas propriedades da superfície celular entre as espécies podem explicar este fenômeno. Segundo Samaranayake Y e Samaranayake L (1994), *C. krusei* possui maior capacidade de colonização inicial em superfícies acrílicas devido a sua alta hidrofobicidade.

Silva et al. (2011a) estudaram a interação de *C. albicans* e *C. glabrata* em células epiteliais bucais (Rhoe). Os autores compararam a invasão e o dano tecidual do grupo interação com o grupo controle (mono-infecção), a invasão epitelial foi mensurada por microscopia confocal laser e o dano epitelial pela mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH). Nos ensaios de infecção simples por *C. glabrata*, essa espécie foi capaz apenas de colonizar o epitélio, porém não conseguiu invadi-lo e infectá-lo, o que contrastou com a extensa invasão de tecido demonstrado pelo grupo controle de *C. albicans*. Já durante a infecção mista entre as duas espécies, *C. glabrata* foi capaz de invadir as células, o que levou a um aumento da liberação de LDH pelas Rhoe comparada à infecção monotípica por *C. glabrata*.

Silva et al. (2013) compararam a formação de biofilme *in vitro* por *C. glabrata* e *C. albicans*, individualmente ou em associação e,

em seguida, examinaram os efeitos antimicrobianos das nanopartículas de prata e nistatina sobre os biofilmes formados após 24 h. Foram realizados ensaios de aderência nos biofilmes formados pelas diferentes espécies de *Candida* sobre a superfície de acrílico na presença de saliva artificial durante 2 h e 48 h. Os resultados mostraram que ambas as espécies foram capazes de se aderir e formar biofilmes em superfícies acrílicas. Um número significativamente maior de UFC/mL foi observado em biofilmes de *C. glabrata* em comparação com os formados por *C. albicans*. Comparando o grupo associação com os biofilmes monotípicos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as UFC/mL. As nanopartículas de prata e a nistatina reduziram a biomassa dos biofilmes de todos os grupos testados, entretanto as nanopartículas de prata apresentaram um efeito significativo na redução de *C. glabrata* em comparação com *C. albicans*. Os autores concluíram que *C. glabrata* e *C. albicans* possuem uma relação neutra em biofilmes, sem aparente cooperação entre as espécies, e as nanopartículas de prata e a nistatina foram efetivas na redução dos biofilmes mistos formados pela associação dessas espécies.

Pathak et al. (2012) estudaram *in vitro* a interação entre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* em biofilmes de 24 h formados em corpo de prova de resina acrílica. A formação de biofilme foi quantificada pela densidade óptica (DO) em ensaios colorimétricos. Os autores encontraram maior atividade metabólica em biofilmes formados pela associação entre as espécies de *C. albicans* e *C. glabrata*, seguida pela interação de *C. albicans* com *C. tropicalis*. Entretanto foi observado um decréscimo na atividade metabólica em duas situações específicas, a primeira quando *C. krusei* estava associada à *C. albicans* e quando o biofilme foi formado com a associação das quatro espécies estudadas.

Diferentes espécies de *Candida* não-*albicans* como *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* são cada vez mais associadas com a morbidade e a mortalidade em populações específicas

quando estão em associações com outras espécies. Em algumas situações, como em pacientes com o HIV, a associação entre espécies de *Candida* é ainda mais elevada (Thein et al., 2009). No estudo de Luque et al. (2009) que foi anteriormente citado, os autores estudaram a prevalência de leveduras do gênero *Candida* em 101 pacientes HIV-positivos e verificaram que 22% apresentavam colonização mista por diferentes espécies de *Candida*, que foram constituídas na maioria das vezes por associações de *C. albicans* e *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*, e *C. albicans* e *C. krusei*.

Nace et al. (2009) estudaram a epidemiologia e a prevalência nos casos de candidemias envolvendo múltiplas espécies em um centro de unidade de terapia intensiva na Philadelphia - USA. Foi realizada uma análise retrospectiva dos episódios entre 2004 e 2007. Os autores encontraram um total de quarenta casos de candidemia nesse período e desses foram identificadas 81 amostras de *Candida*, sendo que 66,7% (54) eram de espécies não *albicans*. As associações mais freqüentes observadas foram de *C. albicans* + *C. glabrata* (37,5%), *C. albicans* + *C. parapsilosis* (20%), e *C. glabrata* + *C. krusei* (12,5%).

Leroy et al. (2009) avaliaram a epidemiologia de infecções invasivas por *Candida* em pacientes hospitalizados de 2005 a 2006 na França. Os autores encontraram 271 casos de candidemia e 305 amostras de *Candida* foram coletadas e identificadas nesse período. *C. albicans*, foi à espécie mais prevalente (n = 174; 57,0%), seguida de *C. glabrata* (n = 51; 16,7%), *C. parapsilosis* (n = 23, 7,5%), *C. krusei* (n = 16, 5,2%), *C. tropicalis* (n = 15; 4,9%), e *C. kefyr* (n = 11, 3,6%). Em 31 pacientes, a infecção foi causada por duas ou três associações entre diferentes espécies de *Candida*.

Lin et al. (2013) investigaram a prevalência e a sensibilidade aos antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* em pacientes infectados pelo HIV. Foram coletadas com auxílio de um swab amostras da orofaringe de 105 pacientes e a sensibilidade dos isolados

foi verificada frente ao fluconazol, voriconazol e anfotericina B. O estudo mostrou que dos 105 pacientes, 54 (51,4%) eram portadores de *Candida* na cavidade bucal, sendo que 20% apresentaram colonização mista por diferentes espécies. Entre os 68 isolados, *C. albicans* foi à espécie mais prevalente (73,5%), seguida por *C. tropicalis* (5,9%), *C. glabrata* (5,9%) e *C. dubliniensis* (4,4%). Entre os isolados de *Candida*, 7,5% e 6% foram resistentes ao fluconazol e voriconazol, respectivamente. Todos os isolados de *Candida* foram sensíveis à anfotericina B.

### **2.3 *Galleria mellonella***

Os estudos com patogênese microbiana, farmacologia e imunologia têm tradicionalmente utilizado modelos vertebrados de mamíferos, tais como camundongos, ratos, coelhos e cobaias, mas foi recentemente complementado pela introdução de uma variedade de modelos invertebrados. Estes novos modelos têm encontrado ampla aplicação na pesquisa de doenças infecciosas (bacterianas e fúngicas) e estão cada vez mais sendo utilizados devido às várias vantagens sobre o uso convencional de mamíferos, incluindo a redução de custo na criação, rapidez nos resultados e menor impacto aos comitês de ética (Mylonakis, 2008; Junqueira, 2012).

O uso de invertebrados como modelo de infecção experimental, nas doenças fúngicas em particular, vem aumentando consideravelmente, principalmente após o estudo realizado em 1996 por Jules Hoffmann e Bruno Lemaitre. Estes pesquisadores franceses ganharam o Prêmio Nobel em Fisiologia/Medicina após verificar que a via de sinalização dos receptores *Toll-like* em *Drosophila melanogaster* é indispensável para a defesa do hospedeiro contra infecções fúngicas. Neste estudo, os pesquisadores confirmaram a importância dessa via,

pois as moscas *Toll*-deficientes não foram capazes de combater *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre et al., 1996). Desde então, além da mosca da fruta *D. melanogaster*, vários outros modelos de invertebrados têm sido explorados para estudar patogenicidade, eficácia de compostos antifúngicos e imunidade inata. Entre esses modelos pode-se citar a lagarta da traça da cera *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans*, amebas de vida livre (*Acanthamoeba castellanii* e *Dictyostelium discoideum*), bicho da seda *Bombyx mori*, mosquito *Culex quinquefasciatus*, barata *Blattella germanica*, entre outros (Steenberger et al., 2004; Lionakis et al., 2005; Chamilos et al., 2008; Evans et al., 2010; Navarro-Velasco et al., 2011).

A lagarta da traça maior da cera de abelha, *Galleria mellonella*, tem sido utilizada como modelo experimental para o estudo de micro-organismos patogênicos, esse invertebrado possui diversas vantagens em relação aos outros modelos invertebrados e vertebrados, como, pode ser mantida a 37°C, apresenta resultados comparáveis com os modelos vertebrados, possui bom tamanho, oferece precisão e facilidade na inoculação de patógenos, não necessita de um local especializado de acondicionamento como os outros modelos invertebrados, possui curto tempo para o curso de infecção fúngica, e além disso pode-se estudar os estágios de filamentação fúngica em seu corpo de gordura (Mylonakis, 2008; Rowan et al., 2009; Fuchs et al., 2010).

Diversos estudos encontraram uma correlação positiva entre a virulência e a resposta do hospedeiro em modelos experimentais tanto de invertebrados como de vertebrados para uma gama de micro-organismos, tais como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Miyata et al., 2003; Mylonakis et al., 2005; Michaux et al., 2011; Desbois, Coote, 2011; Junqueira et al., 2011; Gaddy et al., 2012).

Cotter et al. (2000) foram os pioneiros em estudar a patogenicidade de *Candida* em *G. mellonella*. Foram inoculadas suspensões microbianas na hemolinfa das lagartas, sendo as mesmas incubadas a 30°C por um período de 72 h. A seguir, as taxas de mortalidade foram quantificadas. *C. albicans* foi a espécie mais patogênica causando morte em 90% das lagartas, enquanto que a taxa de mortalidade para as outras espécies foram de: 70% para *C. tropicalis*, 45% para *C. parapsilosis*, 45% para *C. tropicalis*, 20% para *C. krusei* e 0% para *C. glabrata*.

A patogenicidade das leveduras do gênero *Candida* foi estudada em alguns trabalhos utilizando o modelo de *G. mellonella* com correlação positiva tanto com modelos *in vitro* como *in vivo*, porém todos os estudos foram realizados em monoespécies. Junqueira et al. (2011) compararam isolados bucais e sistêmicos de *Candida* quanto à capacidade de formar biofilmes *in vitro* com a patogenicidade de infecção em *G. mellonella*. Foram estudadas as espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. norvegensis* e *C. dubliniensis*. Os autores verificaram que as espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis* que obtiveram maior formação de biofilme *in vitro* também foram as mais patogênicas em *G. mellonella*.

Brennan et al. (2002) estudaram a patogenicidade de cepas mutantes de *Candida* em relação a filamentação nos modelos de *G. mellonella* e de ratos. Os autores demonstraram que a resposta à infecção nos insetos mostra semelhanças com a encontrada em mamíferos, o que possibilita uma redução na necessidade de utilizar mamíferos para testes de virulência de cepas mutantes. Sendo assim, o modelo de invertebrados pode ser uma ferramenta para triagem de cepas mutantes. A capacidade de pesquisar um grande número de mutantes em curto período de tempo, utilizando *G. mellonella*, é uma das vantagens desse modelo em comparação com a utilização de modelos convencionais de vertebrados.

Fuchs et al. (2010) correlacionaram a filamentação de *C. albicans* com sua patogenicidade em *G. mellonella*. Foram estudadas cinco cepas mutantes para os genes BCR1, FLO8, KEM1, SUV3 e TEC1 que desempenham papel fundamental na filamentação, sendo necessários para a formação de biofilme e invasão de macrófagos nas infecções de mamíferos. A cepa mutante FLO8 não formou hifas em *G. mellonella*, e esta também mostrou virulência reduzida nas lagartas. Já a cepa TEC1 foi capaz de filamentar, porém não foi patogênica no modelo testado. Os autores concluíram que somente a filamentação não é suficiente para uma infecção letal em *G. mellonella* e sugeriram que outros fatores de virulência de *Candida* estão associados à patogenicidade *in vivo* e com os genes que regulam a filamentação.

Rossoni et al. (2013) correlacionaram a produção de proteinase e fosfolipase por *Candida* spp. com sua patogenicidade em *G. mellonella*. Foram estudadas 24 cepas clínicas de *Candida* incluindo as espécies de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. norvegensis*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*. A atividade enzimática foi encontrada em 100% das cepas de *C. albicans*, enquanto que para as espécies não-*albicans* foi encontrada taxas de 25% e 43% de produção para proteinase e fosfolipase, respectivamente. As espécies mais patogênicas para *G. mellonella* foram *C. albicans* e *C. dubliniensis*, enquanto *C. glabrata* foi a menos virulenta. Os autores concluíram que a virulência das cepas de *Candida* em *G. mellonella* está correlacionada com a quantidade de enzimas produzidas por cada cepa.

O modelo de *G. mellonella* também tem sido usado para testar a patogenicidade de espécies emergentes de *Candida* e terapias antimicrobianas. Mesa-Arango et al. (2013) investigaram a virulência de *C. tropicalis* em *G. mellonella* em diferentes concentrações, temperaturas e a eficácia de antifúngicos neste modelo de infecção. Quando as larvas foram infectadas com inóculos de diferentes concentrações ( $4 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  e  $5 \times 10^5$  célula/mL), observou-se um efeito dose-dependente sobre

a morte das lagartas. *C. tropicalis* foi patogênica para os animais, tanto a 30°C e 37°C, embora a 37°C a taxa de mortalidade tenha sido mais evidente. As eficácias da anfotericina B, caspofungina, voriconazol e fluconazol foram testadas em diferentes concentrações, e um efeito de proteção e/ou prolongamento da sobrevivência foi observado com todos os fármacos em concentrações equivalentes a dose terapêutica. A carga fúngica aumentou nas lagartas infectadas durante o tempo de infecção e somente a anfotericina B e fluconazol reduziram o número de unidades formadoras de colônias nos animais.

*C. africana* foi anteriormente proposta como uma nova espécie dentro do complexo de espécies *C. albicans*, como ocorreu com *C. dubliniensis*, embora novos estudos a apontem como uma variante incomum dentro da espécie *C. albicans*. Borman et al. (2013) avaliaram e compararam a virulência de isolados de *C. albicans*, *C. africana* e *C. dubliniensis* em modelo de infecção sistêmica de *G. mellonella*. Os autores verificaram que a espécie emergente *C. africana* é significativamente menos patogênica do que *C. albicans* e *C. dubliniensis* no modelo testado.

Chibebe Junior et al. (2013) desenvolveram um sistema *in vivo* para o estudo da terapia fotodinâmica antimicrobiana, isoladamente ou em combinação com antimicrobianos (vancomicina, gentamicina, ampicilina e estreptomicina), em *G. mellonella* infectadas por *Enterococcus faecium*. Lagartas infectadas por *E. faecium* e sem nenhum tratamento foram utilizadas como controle positivo. Os autores verificaram que a taxa de mortalidade de *G. mellonella* foi dependente do número de células bacterianas ( $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC/mL) injetadas na hemolinfa e que todas as cepas testadas foram letais. O grupo tratado com os antimicrobianos ampicilina, gentamicina ou a combinação de ambos prolongaram a sobrevivência dos animais infectados em relação ao grupo controle. Para o desenvolvimento da PDT antimicrobiana, os autores injetaram fotossensibilizador azul de metileno (1 $\mu$ M) na hemolinfa das

lagartas e em seguida as irradiaram. O grupo PDT também prolongou a sobrevivência de *G. mellonella* em relação ao grupo controle. Já a associação das terapias (PDT e antimicrobianos convencionais) prolongou significativamente a sobrevivência de *G. mellonella* quando comparado ao grupo somente tratado com PDT, mostrando que a combinação de terapias é mais eficiente do que a PDT isoladamente. A combinação de terapias mostrou-se eficiente em uma cepa resistente à vancomicina, prolongando significativamente a sobrevivência das lagartas quando comparados com o grupo que utilizou somente PDT, ou tratamento com vancomicina, este resultado sugere que a aplicação da PDT torna a cepa resistente à vancomicina mais suscetível a ação desta. Os autores concluíram que o modelo invertebrado de *G. mellonella* foi eficaz no estudo da PDT antimicrobiana e possibilita a combinação de tratamentos.

Herrero et al. (2013) correlacionaram a proteína transmembrânica *opy2* de *C. albicans* com sua patogenicidade em *G. mellonella*. Esta proteína é necessária para desencadear a fosforilação de *Cek1* por diferentes estímulos, tais como a retomada do crescimento a partir de fase estacionária, a adição de compostos como zymolyase ou durante qualquer agressão do meio externo. *Cek1* faz parte da via MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), uma via intracelular que está envolvida na resposta da célula ao estresse e desempenha papel fundamental no crescimento de hifas e na construção da parede celular. Cepas *opy2* mutantes exibiram maior suscetibilidade na integridade da parede celular e patogenicidade reduzida em *G. mellonella* em comparação com uma cepa padrão de *C. albicans*. Após 72 h de infecção, 70% das lagartas inoculadas com a cepa mutante *opy2* permaneceram vivas, porém 100% das lagartas inoculadas com a cepa padrão morreram. Os autores sugerem que essa proteína *opy2* esteja relacionada com a virulência em *C. albicans*.

Banville et al. (2012) estudaram os efeitos da privação nutricional de *G. mellonella* com sua capacidade de resistir à infecção por *Candida albicans* afim de estabelecer condições padronizadas nos ensaios experimentais com esse modelo de invertebrado. As lagartas que foram privadas de alimentação durante sete dias demonstraram um aumento na suscetibilidade à infecção por *C. albicans*. Além disso, esses animais apresentaram menor densidade de hemócitos e uma redução na expressão de uma série de peptídeos antimicrobianos (lipocalina) e proteínas do sistema imunológico (apolipoprotein e arylphorin) em comparação com os animais que se alimentaram normalmente (controle). Os autores concluíram que a privação de alimento leva a uma redução nas respostas celulares e imunes e uma suscetibilidade aumentada a infecções.

O modelo experimental de *G. mellonella* é recente e cada vez mais tem ganhado aceitação na comunidade científica (Junqueira, 2012), o que permite novas possibilidades para o desenvolvimento e avanço da pesquisa com patógenos humanos.

## **2.4 Candidose experimental**

Os modelos de animais vertebrados são importantes ferramentas para o estudo da patogênese, diagnóstico e interação patógeno-hospedeiro. Entre os modelos de vertebrados, os camundongos são muito utilizados para o estudo da candidose bucal por causa do baixo custo, facilidade de manuseio, viabilidade da técnica, experiência com seu uso e por apresentar sistema imune semelhante ao do ser humano. Além disso, os camundongos são considerados padrão ouro para o estudo da interação patógeno-hospedeiro, não possuem *Candida* como constituinte da sua microbiota bucal e reproduzem condições próximas do ambiente

bucal humano (Samaranayake Y, Samaranayake L, 2001; Clancy et al., 2009).

Hisajima et al. (2008) estudaram o processo de adesão e invasão nos estágios iniciais da infecção por *C. albicans* em modelo murino. Foram utilizados 131 camundongos machos, estes foram anestesiados e, em seguida, inoculados com *C. albicans*. Após 1 e 3 h da inoculação as línguas foram ressecadas e lavadas sequencialmente com solução fisiológica e tripsina a 0,25% para desprender as células não aderidas. Os cortes foram avaliados através da microscopia de luz e de varredura, no grupo de 1 h após a inoculação a maior parte das células de *Candida* aderidas à superfície da língua estavam agrupadas, localizadas principalmente nos espaços entre papilas filiformes e cobertas com uma substância mucoidal. Já nas línguas de 3 h após a inoculação, existiam aglomerados de hifas e leveduras e estas não podiam ser facilmente retirados da superfície da língua pela lavagem com a tripsina. Estes resultados indicam que as hifas de *Candida* começam a invadir a superfície da língua em 3 h após a inoculação e os autores sugerem que a substância mucoidal que cobriam estas células pode ter um papel importante no início da interação entre as células de *Candida* e o epitélio colonizado.

Para a indução da candidose experimental são necessários fatores predisponentes como o uso de antibiótico de amplo espectro (tetraciclina ou penicilina) (Allen et al., 1985; Martins et al., 2011), xerostomia (Jorge et al., 1993a; Jorge et al., 1993b; Totti et al., 2002), influência de hormônios ovarianos (Junqueira et al., 2005) e uso de corticosteróides (Takakura et al., 2003; Ishibashi et al., 2007).

Kanaguchi et al. (2012) avaliaram o efeito do fluxo de proteínas da saliva na colonização inicial de *C. albicans* em modelo murino nos tempos de 30, 60 e 90 min. Os autores utilizaram animais com deleção no gene NOD/SCID.e2f1-/- que em decorrência da mutação apresentavam hipossalivação, diminuição do fluxo das proteínas salivares

(mucina e amilase), falta de IgA e IgG na saliva, e diminuição no número das células NK e animais NOD/SCID.e2f1+/+ foram utilizados como grupo controle. Suspensões de *C. albicans* foram inoculadas na cavidade bucal dos animais depois de uma assepsia prévia com clorexidina. A UFC/mL de *C. albicans* diminuiu progressivamente nos animais controle após a inoculação em relação ao grupo mutante, entretanto, a hipossalivação em NOD/SCID.e2f1-/- não aumentou a colonização de *C. albicans* em comparação com os animais controle. Com esse dados, o estudo sugere que o fluxo de proteínas salivares é um importante fator na colonização de inicial de *C. albicans* e que receptores para *Candida* na saliva podem não estar suficientemente disponíveis na cavidade bucal dos animais NOD/SCID.e2f1-/-.

Os efeitos protetores da saliva humana também já foram estudados na candidose experimental em modelo murino, Kamagata-Kiyoura et al. (2004) inocularam *C. albicans* na cavidade bucal de camundongos imunossuprimidos e em intervalos específicos de 3, 6, 12, 24, e 36 h após a inoculação estes animais receberam 0,1 mL de saliva humana ou água destilada estéril (grupo controle) na cavidade bucal. Após 72 h da inoculação com *C. albicans*, foi realizada recuperação de *C. albicans* na cavidade bucal dos animais para contagem de UFC/mL e uma avaliação macroscópica sobre a superfície das línguas. O estudo mostrou que a UFC/mL e o grau de candidose sobre a superfície das línguas foram significativamente menores no grupo de saliva humana do que no grupo controle. Os autores sugerem que a administração de saliva humana pode inibir a colonização da cavidade bucal e o processo de infecção por *C. albicans* em modelo de camundongo imunossuprimido.

Junqueira et al. (2005) avaliaram a influência dos hormônios ovarianos na candidose experimental de ratas ovariectomizadas. Os autores compararam o número de lesões e a recuperação de *C. albicans* em animais ovariectomizados com animais controle. Após três inoculações consecutivas de *C. albicans*, os animais

foram eutanasiados nos intervalos de 6 h, 24 h, 7 dias e 15 dias após a última inoculação. Os animais ovariectomizados apresentaram menor recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal e menor ocorrência de lesões na língua, sugerindo que os hormônios ovarianos possuem influência significativa sobre a candidose bucal.

Os corticosteróides são comumente utilizados pelas suas propriedades anti-inflamatória e imunossupressora. É um dos efeitos colaterais associados com a sua utilização prolongada é a candidose bucal e da orofaringe, pois esses medicamentos inibem processos associados com a inflamação e resposta imune (Tanaka et al., 2002). O modelo murino de candidose bucal em camundongos imunossuprimidos por corticosteróide desenvolvido por Takakura tem sido adotado atualmente por vários autores para o estudo do processo da patogênese da candidose e de novas terapias, como a terapia fotodinâmica (Mima et al., 2010; Costa et al., 2012; Dovigo et al., 2013) e a fitoterapia (Taguchi et al., 2010; Hayama et al., 2010; Taguchi et al., 2011).

Okada et al. (2013) estudaram o processo inicial de infecção por *C. albicans* e sua resposta imunológica em 115 camundongos imunossuprimidos por prednisolona. Após a inoculação de *Candida*, foi realizada recuperação de leveduras de *Candida* da cavidade bucal dos animais, análise macroscópica e microscópica nos seguintes tempos: 24, 48, 72, 96 e 144 h. Foi realizada análise histopatológica por coloração de PAS e imunofluorescência e as citocinas IL-4, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  de amostras das lesões das línguas foram quantificadas por ELISA. O estudo mostrou que *C. albicans* invadiu a superfície da língua dentro de 24 h e iniciou a formação das placas brancas. Na análise histológica foi observada a presença de inflamação aguda localizada nos tecidos superficiais das línguas subjacente as hifas de *C. albicans*. Entre 24 e 48 h após a última inoculação houve uma exacerbação nos sinais e sintomas e a partir de então os sintomas começaram a diminuir. Em relação às citocinas, houve um aumento na produção de IL-12 e do IFN- $\gamma$

somente no grupo de 48 h após a inoculação. Os autores concluíram que a pior condição no processo de desenvolvimento da candidose em modelo murino foi encontrada 48 h após a inoculação. Nesse tempo pós-inoculação, a superfície das línguas estavam cobertas com hifas de *Candida*, tinham um acúmulo de neutrófilos sob as lesões e continham níveis elevados de IL-12 e do IFN- $\gamma$ .

O estudo da fitoterapia como alternativa ao tratamento das candidoses também foi testado em modelo murino, Ninomiya et al. (2012) avaliaram a eficácia terapêutica do óleo de *Melaleuca alternifolia*, e o seu componente principal, o terpinen-4-ol após 3 h da inoculação de *C. albicans* na cavidade bucal dos camundongos. Os autores utilizaram dois isolados clínicos de *C. albicans*, um isolado suscetível ao fluconazol (TIMM 2640) e outro resistente aos azóis (TIMM 3163). Os tratamentos com o óleo essencial ou terpinen-4-ol foram realizados com o auxílio de um swab após 3 h e 24 h da inoculação de *C. albicans*. O estudo mostrou que os tratamentos diminuíram os sinais de candidose na língua dos animais e o número de células viáveis na recuperação, para os animais infectados tanto com a cepa sensível ao fluconazol quanto a resistente. Estes resultados sugerem que o óleo de *M. alternifolia* e o terpinen-4-ol possuem potencial terapêutico nos casos de candidose bucal induzido por isolados sensíveis ou resistentes aos antifúngicos.

Dovigo et al. (2013) estudaram em modelo murino a terapia fotodinâmica (PDT) e utilizaram a curcumina, um fitoterápico, como fotossensibilizador. Quarenta camundongos imunossuprimidos com candidose bucal induzida após cinco dias receberam curcumina tópica e irradiação com um diodo emissor de luz (LED). Animais sem qualquer tratamento foram utilizados como controle. Os autores verificaram que a PDT utilizando curcumina causou redução de 4  $\log_{10}$  de *C. albicans* em relação ao grupo controle. O estudo mostrou que a curcumina associada ao LED foi eficaz para a inativação *in vivo* de *C. albicans* sem danificar o tecido epitelial dos animais.

Costa et al. (2012) também estudaram a ação antifúngica da terapia fotodinâmica (PDT) em modelo de camundongo imunossuprimido. Um total de 56 animais com candidose bucal foram submetidos à PDT e após o tratamento, foi realizado a recuperação e quantificação de *C. albicans* (UFC/mL) da cavidade bucal dos animais para comparar com animais com candidose e sem tratamento (controle). Os autores verificaram que a PDT reduziu significativamente a quantidade de *C. albicans* presente nas lesões de candidose e com isso o estudo demonstra que a PDT foi efetiva *in vivo* contra *C. albicans*.

Até o presente momento apenas Yoshioka et al. (2012) estudaram a candidose bucal em camundongos com uma espécie não-*albicans* utilizando o modelo murino desenvolvido por Takakura, que induz a infecção pela associação do uso de corticosteróide com um antimicrobiano (tetraciclina). Os autores tentaram comparar a patogênese de *C. dubliniensis* com *C. albicans*, porém não se desenvolveu candidose bucal em nenhum animal pela infecção com *C. dubliniensis*.

Recentemente, Mosci et al. (2013) descreveram um novo modelo de monitoramento em tempo real de candidose experimental em camundongos. Os animais foram imunossuprimidos por injeções cutâneas de acetato de cortisona e após dois dias foi inoculado com o auxílio de um swab um isolado de *C. albicans* geneticamente bioluminescente. Os autores adotaram a bioluminescência como técnica de imagem *in vivo* para analisar as línguas, pois essa cepa de *C. albicans* expressa constitutivamente luciferase, essas são enzimas que catalisam as reações biológicas transformando energia química em energia luminosa. Este estudo representa uma inovadora ferramenta para testes de progressão em tempo real de infecção, identificação de sítio alvo de *C. albicans* em órgãos específicos, avaliação de terapias anti-fúngicas e proporciona estudos afim de visualizar a disseminação de candidoses localizadas para candidemias.

### 3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Avaliar as interações de *C. albicans* com *C. glabrata* e *C. krusei* em biofilmes formados *in vitro* por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL);
- b) Estudar as interações das espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* na candidose experimental em modelos invertebrados de *G. mellonella* por meio da análise da curva de sobrevivência e contagem de UFC/mL de *Candida* na hemolinfa;
- c) Analisar as interações das espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* na candidose experimental em camundongos imunossuprimidos por meio da contagem de UFC/mL de *Candida* recuperadas da cavidade bucal, análise macroscópica e microscópica do dorso da língua;
- d) Comparar os diferentes modelos para o estudo das interações microbianas entre as espécies de *Candida*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Comitê de Ética**

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos/UNESP, conforme protocolo nº 14/2011 – PA/CEP (Anexo) e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **4.2 Micro-organismos**

Foram estudadas 3 cepas padrão de *Candida*, incluindo *C. albicans* (ATCC 18804), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. glabrata* (ATCC 90030). Todas as cepas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia / UNESP. Os ensaios de formação *in vitro* de biofilmes homotípicos e heterotípicos e indução de candidose experimental, tanto no modelo invertebrado como no vertebrado, foram divididos nos seguintes grupos: *C. albicans* + *C. glabrata*, *C. albicans* + *C. krusei*, *C. glabrata* + *C. krusei*, somente *C. albicans*, somente *C. krusei* e somente *C. glabrata*. Os grupos e a distribuição das amostras estão representados no Quadro 1.

Quadro 1 - Número de ensaios e animais distribuídos em relação aos grupos experimentais

Grupos	Biofilme <i>in vitro</i>	<i>Galleria mellonella</i>		Camundongos
		Ensaio de sobrevivência	Contagem de UFC/mL	
<i>C. albicans</i>	10	16	75	8
<i>C. glabrata</i>	10	16	75	8
<i>C. krusei</i>	10	16	75	8
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	10	16	75	8
<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i>	10	16	75	8
<i>C. glabrata</i> + <i>C. krusei</i>	10	16	75	8
<b>Total</b>	60	546		48

#### 4.3 Estudo das interações microbianas em biofilme formado *in vitro*

##### 4.3.1 Preparo da suspensão de *Candida*

Para cada cepa de *Candida* foi preparada suspensão padronizada de micro-organismo contendo  $10^7$  células/mL. As cepas de *Candida* foram cultivadas em ágar sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai, India) por 24 h a 37°C. A seguir, cada cepa foi semeada em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB, Himedia, Mumbai, India) acrescido de 100 µM de glicose (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) e incubada a 37°C por 18 h.

O crescimento foi centrifugado a 10000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensão em 10 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%). A contagem do número de células em suspensão foi determinada em Câmara de Neubauer espelhada (Laboroptik GmbH, Alemanha) .

#### 4.3.2 Formação do biofilme *in vitro*

Para a formação dos biofilmes foi utilizada a metodologia descrita por Seneviratne et al. (2009) com algumas modificações.

Inicialmente, foi pipetado 200  $\mu\text{L}$  da suspensão padronizada do micro-organismo em placas de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA). Para a formação dos biofilmes heterotípicos foi colocado 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de cada espécie de *Candida*. A placa foi incubada em agitação a uma rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) a 37°C por 90 min para fase inicial de adesão. Decorrido este período, a suspensão de *Candida* foi delicadamente aspirada e cada poço foi lavado com 200  $\mu\text{L}$  de solução fisiológica tampão fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido por 2 vezes para a remoção das células não aderidas. Em seguida, foi pipetado 200  $\mu\text{L}$  de Caldo YNB (Difco, Detroit, USA) acrescido de 100  $\mu\text{M}$  de glicose e as placas foram incubadas a 37°C por 48 h em agitação (Quimis, Diadema, São Paulo). O caldo foi trocado a cada 24 h.

Após 48 h, o conteúdo da placa com os biofilmes formados foi aspirado e lavado 4 vezes com solução fisiológica tampão fosfato (PBS). A seguir, foi colocado 200  $\mu\text{L}$  de PBS em cada poço da placa.

#### 4.3.3 Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) do biofilme

O biofilme formado no fundo da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) foi cuidadosamente raspado com um palito de madeira estéril. A seguir, foi aspirado 100  $\mu\text{L}$  de cada

poço e transferido para um tubo falcon contendo 6 mL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS).

Os tubos foram homogeneizados por 30 s utilizando-se homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD 2200 - Bandelin Eletronic) com potência de 50 W, para desagregar o biofilme. A partir da solução contendo PBS e o biofilme desprendido foram feitas diluições seriadas até  $10^{-4}$ . Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em placas de *Petri* contendo meio cromogênico HiCrome *Candida* (Himedia, Mumbai, India). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Após o período de incubação, as espécies de *Candida* dos biofilmes heterotípicos foram diferenciadas pela cor da colônia em ágar HiCrome *Candida*: verde clara para *C. albicans*, roxa para *C. krusei* e magenta para *C. glabrata*.

A seguir, para cada espécie de *Candida* foi determinado o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e os valores transformados em logaritmo.

#### **4.4 Estudo das interações microbianas em modelo de *Galleria mellonella***

##### **4.4.1 Infecção de *G. mellonella* por *Candida***

Para este estudo foi utilizada a metodologia descrita por Mylonakis et al. (2005) e Cowen et al. (2009). Foram utilizadas *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal de aproximadamente 250 mg cedidas pela pesquisadora Márcia Prata da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA.

As suspensões de cada cepa de *Candida* foram preparadas a partir de culturas em 5 mL de caldo YNB a 37°C por 18 h. A seguir, as células foram centrifugadas a 2000 Xg por 10 min, sendo o

sobrenadante descartado. A seguir, o depósito foi ressuspendido em PBS e misturado em agitador de tubos (vortex) por 30 s. Essa lavagem das células foi repetida por mais 2 vezes. As densidades celulares foram ajustadas em  $10^5$  células viáveis/mL por meio de hemocitômetro.

Antes da injeção, foi feita anti-sepsia da área com algodão embebido em álcool.

Um inóculo de 10  $\mu$ L da suspensão de *Candida* foi injetado na hemolinfa de cada larva através da última *proleg*, utilizando seringa Hamilton de 10  $\mu$ L. Para os grupos que associam duas espécies de *Candida* foi injetado 5  $\mu$ L da suspensão de cada espécie nas últimas duas *proleg*. E um grupo com 5  $\mu$ L de suspensão monotípica de *Candida* e 5  $\mu$ L de PBS também foi realizado para cada espécie. As densidades celulares dos inóculos de *Candida* foram confirmadas por meio da determinação de UFC/mL em ágar sabouraud dextrose.

Para cada tempo nos grupos interação, foi incluído um grupo controle contendo 5 lagartas no qual foi injetado 5  $\mu$ L de PBS na última prolegue esquerda e 5  $\mu$ L de PBS na última prolegue direita com o objetivo de analisar a ocorrência de mortes de *G. mellonella* provocadas pela injúria traumática das injeções.

#### 4.4.2 Análise de sobrevivência de *G. mellonella*

Após a injeção, as lagartas foram armazenadas em recipientes de plástico a 37°C e o número de *G. mellonella* mortas foi anotado diariamente durante 5 dias. As lagartas foram consideradas mortas quando não apresentarem nenhum movimento ao toque. A curva de morte e estimativa das diferenças na sobrevivência foram determinadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) utilizando o Programa GraphPad Prism.

#### 4.4.3 Contagem de UFC/mL de *Candida* na hemolinfa de *G. mellonella*

Para quantificar o número de cada espécie de *Candida* presente na infecção em *G. mellonella*, as células fúngicas foram extraídas da hemolinfa no tempo imediatamente após a inoculação (0) e nos tempos 4, 8, 12, 18 e 24 h após as lagartas serem infectadas com as diferentes espécies de *Candida*. Para cada grupo e tempo foi utilizado um pool de 5 lagartas para coleta de hemolinfa suficiente para realização das diluições seriadas. Como o experimento foi realizado em triplicata, para cada grupo e tempo foram utilizadas 15 lagartas.

Em cada tempo indicado, as lagartas sobreviventes por grupo foram cortadas por meio de uma lâmina de bisturi no sentido céfalo caudal e espremidas para remoção da hemolinfa. A hemolinfa das lagartas foi acondicionada em tubos Eppendorf com um volume final de cerca de 100 µL. Em seguida, a hemolinfa extraída foi homogeneizada e diluída serialmente. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em placas de *Petri* contendo meio cromogênico HiCrome *Candida* (Himedia, Mumbai, India). As placas foram incubadas por 72 h a 37°C e posteriormente foi feita a contagem das colônias para o cálculo de UFC/mL.

### **4.5 Estudo das interações microbianas em modelo de camundongo imunossuprimido**

#### 4.5.1 Animais experimentais

Foram utilizados 48 camundongos albinos machos (*Mus musculus*) provenientes do Biotério do Instituto de Ciência e

Tecnologia/UNESP, sendo utilizados 24 animais para o estudo de candidose experimental mista induzida pelas associações de *C. albicans* com *C. glabrata*, *C. albicans* com *C. krusei* e *C. glabrata* com *C. krusei* e 24 animais para os grupos controles que foram inoculados somente com *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*. A linha do tempo com a distribuição dos dias e seus respectivos experimentos estão representados no Quadro 2.

Quadro 2 - Linha do tempo com a distribuição dos dias e seus respectivos experimentos

<b>Dias</b>	<b>Experimento</b>
1º dia	1ª imunossupressão
2º dia	Inoculação das suspensões de <i>Candida</i>
3º dia	2ª imunossupressão
4º dia	Inoculação das suspensões de <i>Candida</i>
5º dia	3ª imunossupressão
6º dia	Recuperação, eutanásia, análise macroscópica e preparo para análise histológica.

#### 4.5.2 Verificação de colonização natural por *Candida* spp. na cavidade bucal dos camundongos

Antes de iniciar a indução de candidose bucal por *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* foi verificada a colonização natural por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de todos os animais. Para isto foi coletado, com o auxílio de um swab estéril, material de toda a cavidade bucal, principalmente do dorso da língua. O swab foi imediatamente semeado em placas com ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) acrescido de 0,1 mg de cloranfenicol por mL de meio (Vixmicina, São Paulo, Brasil). As placas foram incubadas a 37°C por 48

h, e quando não havia crescimento, as placas foram incubadas por mais 5 dias em temperatura ambiente. Foram utilizados somente animais com cultura negativa para *Candida* na cavidade bucal.

#### 4.5.3 Imunossupressão e administração de tetraciclina

Os animais foram imunossuprimidos com três injeções via intramuscular de prednisolona (Depo-Medrol, Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, Brasil) na região interna da pata traseira na dose de 100 mg/Kg de massa corporal, intercaladas com as duas inoculações de *Candida* conforme demonstrado no Quadro 2.

Na água de beber foi administrado cloridrato de tetraciclina (Terramicina, Pfizer) na concentração de 0,83 mg/mL iniciando 1 dia antes da infecção e mantido até o final do experimento. A imunossupressão e administração de tetraciclina foram realizadas de acordo com o modelo experimental desenvolvido por Takakura et al. (2003) e Mima et al. (2010) com algumas modificações.

#### 4.5.4 Preparo da suspensão de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*

Cada cepa de *Candida* foi cultivada em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) a 37°C por 24 h. O crescimento foi suspenso em 5 mL de PBS e centrifugado a 2000Xg durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido novamente. O sedimento foi suspenso em 5 mL de PBS e padronizado em 10<sup>8</sup> células viáveis/mL em hemocítômetro.

#### 4.5.5 Inoculação da suspensão de *Candida* na cavidade bucal dos camundongos

A inoculação da suspensão de *Candida* foi realizada conforme Takakura et al. (2003) com algumas modificações. Os animais foram sedados via intramuscular com injeções de 50 µL de cloridrato de clorpromazina na concentração de 2 mg/mL. Os camundongos foram inoculados com auxílio de um swab estéril encharcado na suspensão do micro-organismo padronizada em  $10^8$  células/mL esfregando por 3 min sobre o dorso da língua, um dia após a primeira imunossupressão e após a segunda imunossupressão. Para os grupos com associação de espécies foi realizado o mesmo procedimento, porém o swab foi encharcado em suspensões mistas padronizadas.

#### 4.5.6 Recuperação de *Candida* da cavidade bucal dos camundongos

Após 2 dias da segunda inoculação, foram coletadas amostras do dorso da língua dos animais com swab, os quais foram imediatamente colocados em tubos de ensaio contendo 0,99 mL de PBS, e agitado durante 30 s. Foram realizadas diluições seriadas. A seguir, 0,1 mL de cada diluição foi semeada em duplicata na superfície de placas contendo meio cromogênico HiCrome *Candida* (Himedia, Mumbai, India) para diferenciar as espécies recuperadas. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Foram contadas colônias típicas de *Candida* em placas que apresentaram de 30 a 300 colônias para a determinação de UFC/mL. As placas contendo número de colônias inferior a 30 na diluição  $10^{-2}$  foram consideradas como  $10^{-1}$  células de *Candida*.

#### 4.5.7 Eutanásia dos animais

A eutanásia dos camundongos foi realizada 2 dias após a segunda inoculação de *Candida*. Esse procedimento foi realizado administrando-se dose excessiva de anestésico. Após anestesia, foi coletado material do dorso da língua para recuperação de *Candida* conforme descrito no item acima 4.5.6. A seguir, as línguas foram removidas para a realização das análises macroscópica e microscópica.

#### 4.5.8 Análise macroscópica de *Candida* no dorso da língua

Durante a realização dos tratamentos experimentais e após a eutanásia dos animais, foram observadas lesões características de candidose pseudomembranosa no dorso da língua dos camundongos e foram atribuídos escores de 0-4 de acordo com as lesões: 0, normal; 1, placas brancas em menos de 20%; 2, placas brancas variando de 21-90 %; 3, placas brancas em mais de 91%; 4, placa branca espessa como pseudomembranas em mais de 91% (Takakura et al. 2003). As línguas retiradas foram observadas com o auxílio de lupa estereoscópica (Zeiss), com aumento de 6,5; 8; 10 e 12,5 vezes.

#### 4.5.9 Análise microscópica de *Candida* no dorso da língua

Para a análise microscópica das lesões, as línguas foram fixadas em formol a 10% por 24 h e seccionadas em duas partes no sentido sagital. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes seriados

de 5  $\mu\text{m}$  de espessura, que foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

A presença de candidose foi pesquisada em toda a superfície do dorso da língua e a descrição dos cortes histológicos foi realizada de acordo com a presença de leveduras e hifas, localização e extensão das lesões e alterações dos tecidos envolvidos.

A presença de leveduras e hifas foi quantificada de acordo com a metodologia de Junqueira et al. (2005), atribuindo-se os seguintes escores para os campos histológicos: 0, ausência de leveduras e hifas; 1, de 1 a 5; 2, de 6 a 15; 3, de 16 a 50; 4, mais de 50.

Foram observadas as seguintes alterações teciduais no dorso da língua de cada camundongo: hiperplasia epitelial, desorganização da camada basal, exocitose, espongiose, perda das papilas filiformes, hiperqueratose e formação de microabscessos intraepitelial. Para o infiltrado inflamatório crônico, foram atribuídos os seguintes escores: 0 (ausência de células inflamatórias), 1 (infiltrado inflamatório discreto), 2 (infiltrado inflamatório moderado) e 3 (infiltrado inflamatório acentuado).

#### **4.6 Análise Estatística**

A análise dos dados de UFC/mL dos biofilmes *in vitro*, de *Candida* na hemolinfa de *G. mellonella* e da recuperação dos camundongos foi feita por Análise de Variância, Teste de Tukey ou *t* de Student. A análise da curva de sobrevivência foi realizada no programa Graph Pad Prism utilizando o teste Log-rank (Mantel-Cox). Para avaliação dos escores obtidos na análise macroscópica e histológica foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estudo das interações microbianas em biofilme formado *in vitro*

Foram analisados os dados de UFC/mL do biofilme formado *in vitro* de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* tanto nos grupos monotípicos quanto nos heretotípicos. Inicialmente, todos os dados foram submetidos à análise estatística descritiva conforme demonstrado nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Estatística descritiva dos valores de UFC/mL (Log) obtidos na contagem de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* em biofilmes monotípicos formados *in vitro* (grupos controle)

<b>Espécies</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>
<i>C. albicans</i>	6,952	0,047	6,869	6,944	7,025
<i>C. krusei</i>	6,039	0,089	5,934	6,004	6,199
<i>C. glabrata</i>	6,487	0,073	6,342	6,498	6,591

DP: desvio-padrão

Tabela 2 - Estatística descritiva dos valores de UFC/mL (Log) obtidos na contagem de *C. albicans* e *C. krusei*, *C. albicans* e *C. glabrata* e *C. glabrata* e *C. krusei* em biofilmes heterotípicos formados *in vitro* (grupo interação)

<b>Interação</b>	<b>Espécie</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>
<i>C. albicans</i> e	<i>C. albicans</i>	5,769	0,076	5,643	5,767	5,892
<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	5,728	0,133	5,519	5,716	5,898
<i>C. albicans</i> e	<i>C. albicans</i>	6,735	0,122	6,491	6,728	6,929
<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	6,074	0,314	5,301	6,130	6,519
<i>C. glabrata</i> e	<i>C. glabrata</i>	5,697	0,134	5,477	5,699	5,903
<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	6,563	0,179	6,146	6,585	6,792

DP: desvio-padrão

Em biofilmes monotípicos, o melhor crescimento foi observado para *C. albicans* (Tabela 1). Para os biofilmes heterotípicos a maior contagem de UFC/mL ocorreu para a interação entre *C. albicans* e *C. glabrata*, considerando a contagem de cada espécie (Tabela 2).

As figuras 1, 2 e 3 representam o crescimento, em UFC/mL, das espécies quando organizados em biofilmes monotípicos e heterotípicos. Em relação às interações com *C. albicans*, podemos verificar que as três espécies estudadas apresentaram um menor crescimento na interação quando comparadas com o grupo controle (Figura 1 e 2), sugerindo que na formação e amadurecimento do biofilme entre *C. albicans* e espécies não-*albicans* há uma relação ecológica de competição.

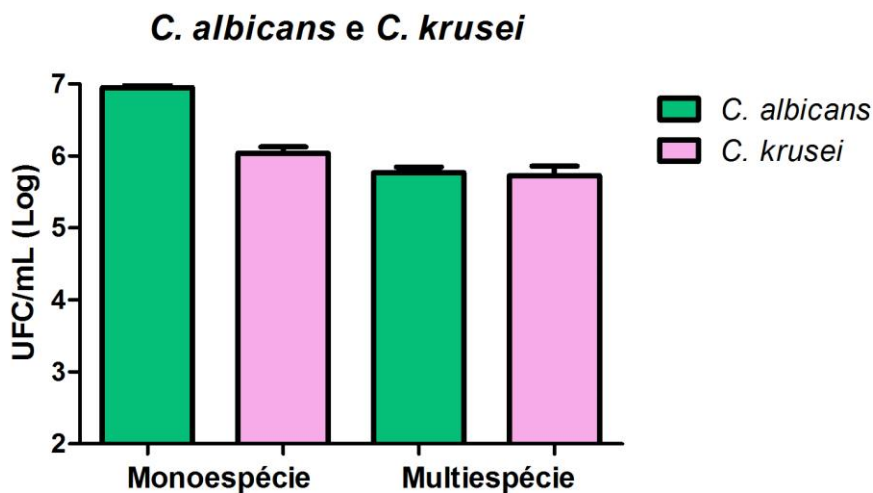


Figura 1 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de *C. albicans* e *C. krusei* quando organizados em biofilmes monotípicos e heterotípicos. Teste *t* de Student: *C. albicans* no biofilme monoespécie e *C. albicans* no biofilme multiespécie ( $p=0,0001$ ); *C. krusei* no biofilme monoespécie e *C. krusei* no biofilme multiespécie ( $p=0,0001$ ).

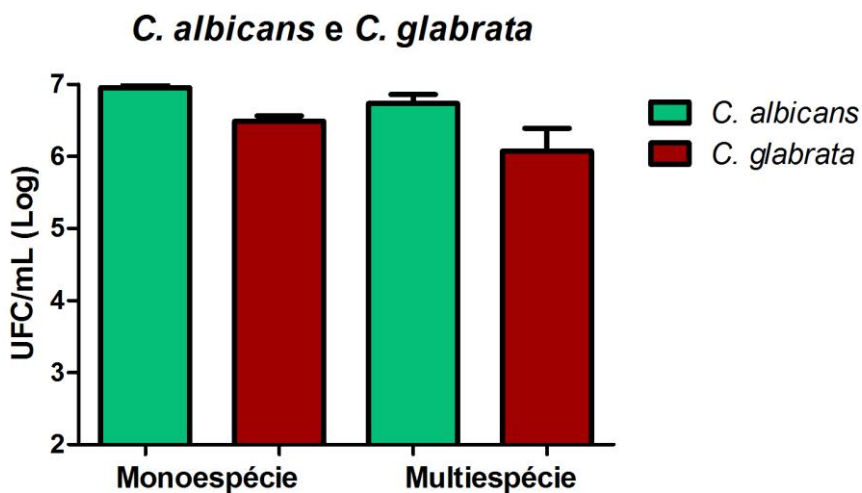


Figura 2 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de *C. albicans* e *C. glabrata* quando organizados em biofilmes monotípicos e heterotípicos. Teste *t* de Student: *C. albicans* no biofilme monoespécie e *C. albicans* no biofilme multiespécie ( $p=0,0001$ ); *C. glabrata* no biofilme monoespécie e *C. glabrata* no biofilme multiespécie ( $p=0,0008$ ).

Para a interação entre as espécies não-*albicans*, *C. krusei* em infecção monoespécie e multiespécie, verificou-se que a contagem de UFC/mL no grupo monoespécie foi significativamente maior ( $6,56 \log_{10}$ ) em relação ao grupo monoinfecção ( $6,03 \log_{10}$ ) ( $p= 0,0001$ ). *C. glabrata* foi recuperado  $6,48 \log_{10}$  nas infecções monoespécies e  $5,69 \log_{10}$  na infecção multiespécie ( $p=0,0001$ ). Esses dados sugerem que o crescimento de *C. krusei* foi maior na presença de *C. glabrata*. No entanto, *C. glabrata* apresentou menor crescimento na interação quando comparada com o grupo monotípico (Figura 3).

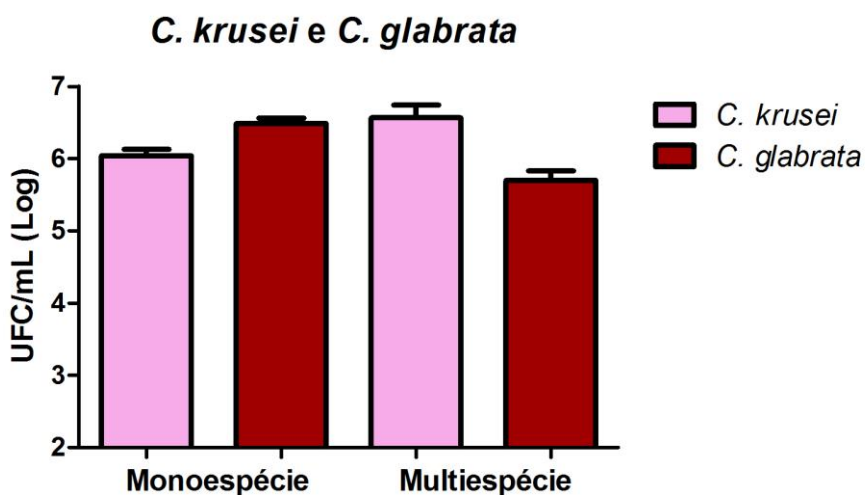


Figura 3 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de *C. krusei* e *C. glabrata* quando organizados em biofilmes monotípicos e heterotípicos. Teste *t* de Student: *C. krusei* no biofilme monoespécie e *C. krusei* no biofilme multiespécie ( $p=0,0001$ ); *C. glabrata* no biofilme monoespécie e *C. glabrata* no biofilme multiespécie ( $p=0,0001$ ).

## 5.2 Estudo das interações microbianas em modelo de *G. mellonella*

### 5.2.1 Análise de sobrevivência de *G. mellonella*

Na candidose experimental em modelo de invertebrados de *G. mellonella*, verificou-se que as lagartas infectadas com suspensões homotípicas (grupo controle) de *C. albicans* apresentaram 100% de mortalidade após 18 h da infecção. Já as espécies *C. krusei* e *C. glabrata* foram menos patogênicas às lagartas de *G. mellonella*, apresentando taxa de mortalidade de 34 e 19% respectivamente após 96 h da infecção (Figura 4A).

Nos grupos interação entre espécies de *Candida*, pode-se observar um aumento na taxa de sobrevivência de *G. mellonella* infectada por suspensões heterotípicas em relação ao grupo infectado por suspensão monotípica de *C. albicans* (grupo controle). Comparando a curva de sobrevivência pelo teste de Log-rank os grupos de interação de *C. albicans* com *C. glabrata* (Figura 4B) e de *C. albicans* com *C. krusei* (Figura 4C) resultaram em menores taxas de morte comparados com grupo *C. albicans*, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Além disso, observou-se que para atingir 100% de mortalidade, foram necessárias 96 h de infecção mista por *C. albicans* e *C. krusei* e 72 h na infecção mista por *C. albicans* e *C. glabrata*.

Para verificar se as menores taxas de morte observadas no grupo interação ocorreram pelo menor inóculo de *C. albicans* injetado nas lagartas desse grupo (injeção heterotípica: 5 µL de *C. albicans* e 5 µL de *C. krusei* ou *C. glabrata*; injeção homotípica: 10 µL de *C. albicans*), foi realizado um outro experimento no qual foi injetado uma suspensão monotípica contendo 5 µL de *C. albicans* e 5 µL de PBS. Nesse grupo

experimental todas as lagartas morreram em 18 h assim como no grupo onde foi inoculado 10  $\mu$ L da suspensão de *C. albicans* (Figura 5).

De acordo com os resultados apresentados, podemos confirmar que os grupos de interação apresentaram menor taxa de infecção letal quando comparados com o grupo controle de *C. albicans*, sugerindo que na interação *C. albicans* - *C. krusei* e na interação *C. albicans* - *C. glabrata* houve uma relação de competição/antagonismo entre as espécies.

Em relação às espécies não-*albicans*, verificou-se que as lagartas infectadas com suspensões homotípicas (grupo controle) de *C. krusei* e *C. glabrata* apresentaram taxa de mortalidade de 34 e 19% respectivamente após 96 h da infecção, já no grupo interação observou morte em 37% das lagartas em 96 h não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e interação como demonstrado na figura 6.

Para cada grupo, foi incluído um grupo controle contendo 16 lagartas no qual foi injetado 5  $\mu$ L de PBS na última prolegue esquerda e 5  $\mu$ L de PBS na última prolegue direita com o objetivo de analisar a ocorrência de mortes de *G. mellonella* provocadas pela injúria traumática das injeções.

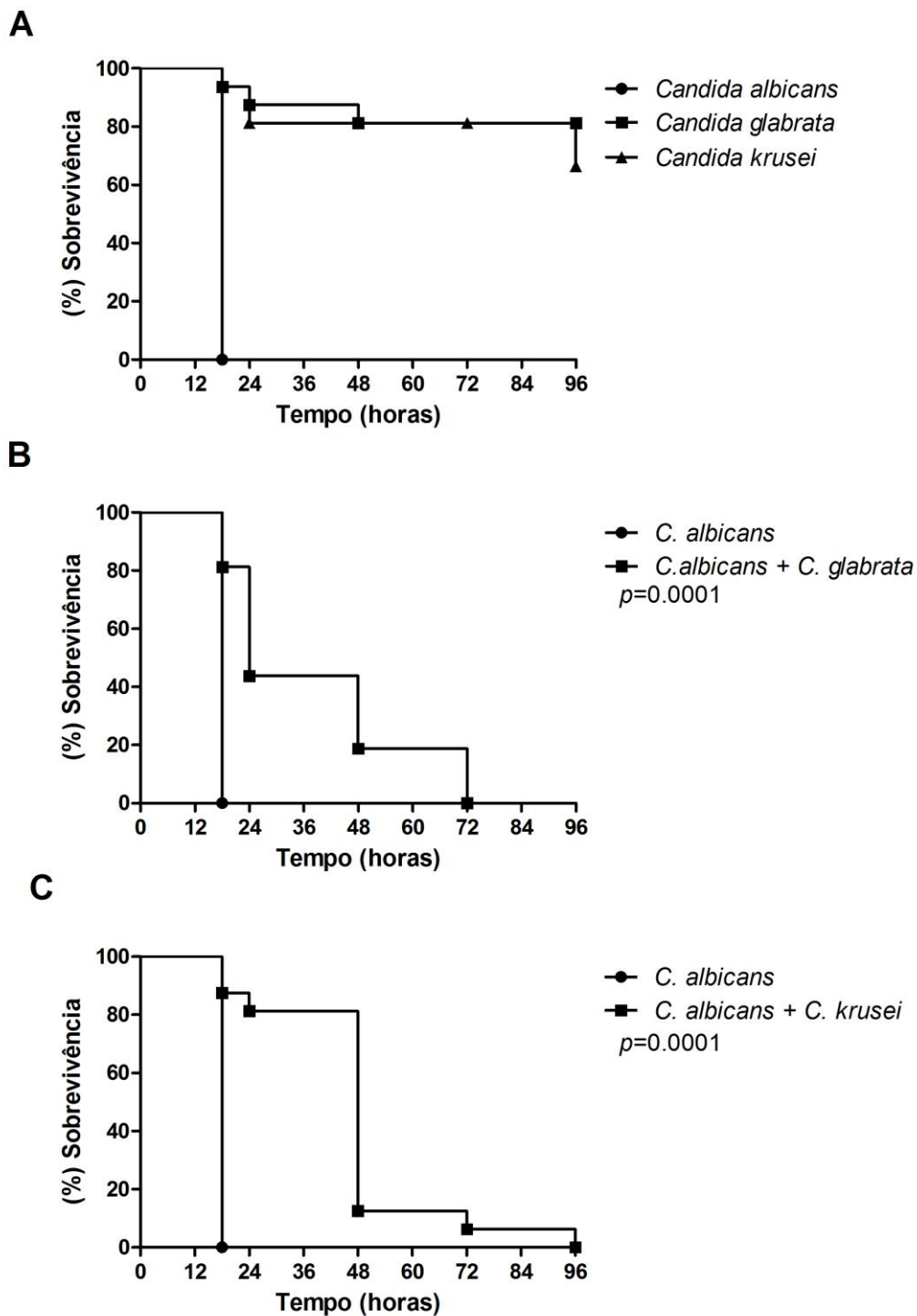


Figura 4 - Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas por cepas de *Candida*. A) Infecção monotípica por *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* (grupos Controle); B) Interação entre *C. albicans* com *C. glabrata* quando comparada ao grupo controle de *C. albicans* ( $p=0,0001$ ); C) Interação entre *C. albicans* com *C. krusei* quando comparada ao grupo controle de *C. albicans* ( $p=0,0001$ ).

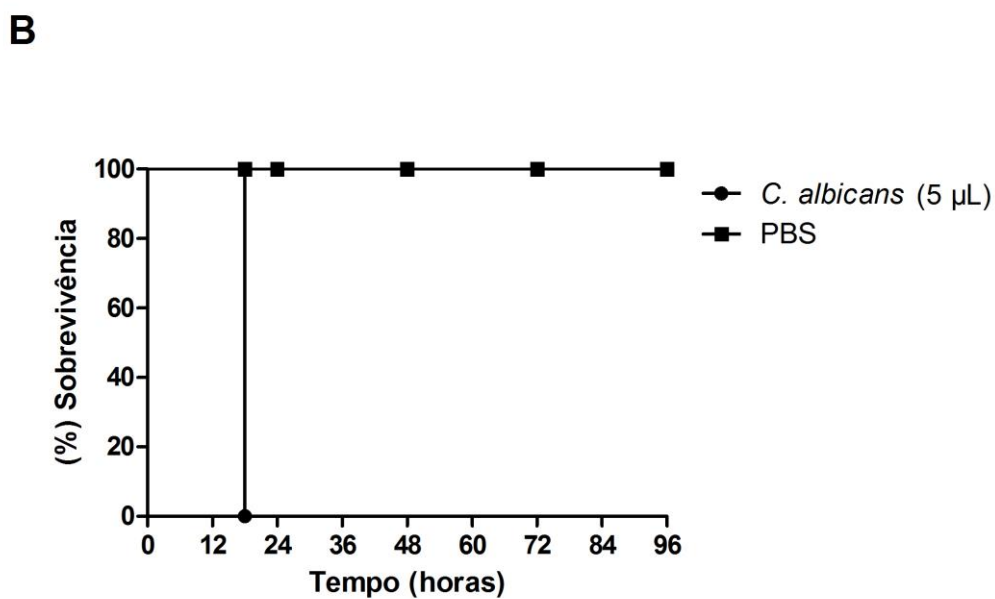
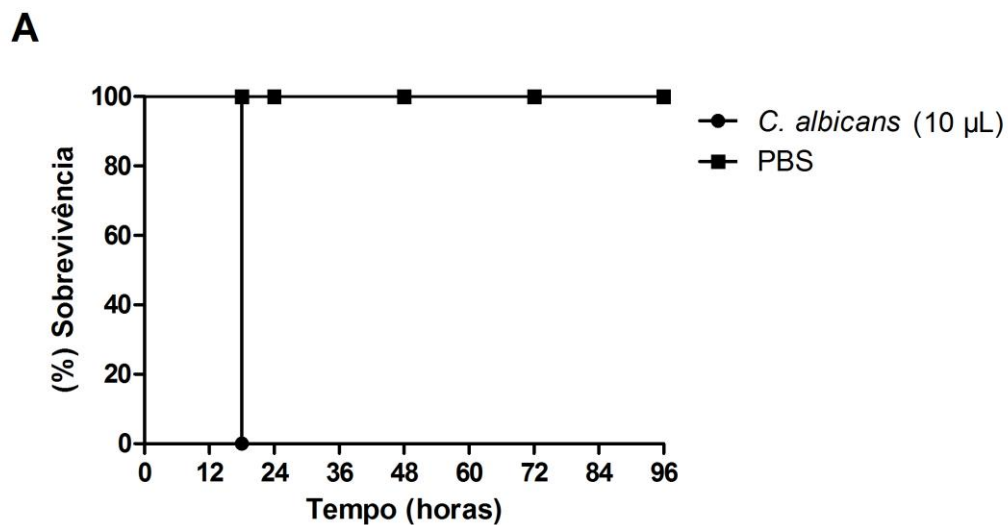


Figura 5 - Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans*. A) Infecção monotípica por *C. albicans*, na qual foi injetado na hemolinfa das lagartas 10 µL de suspensão fúngica; B) Infecção monotípica por *C. albicans*, na qual foi injetado na hemolinfa das lagartas 5 µL de suspensão fúngica e 5 µL de PBS. Um grupo PBS foi incluído como controle negativo para avaliar e acompanhar o estado de saúde das lagartas de *G. mellonella* durante todo o experimento.

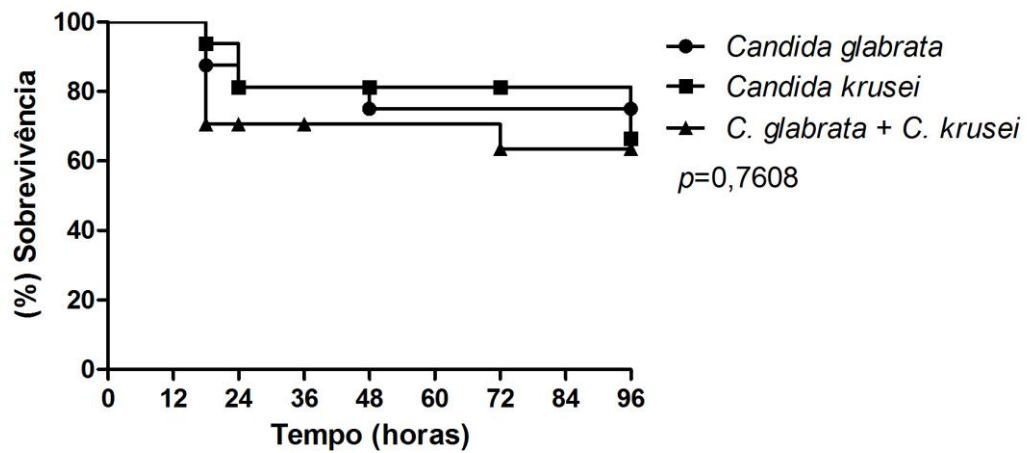


Figura 6 - Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas por cepas de *Candida*. Infecção monotípica por *C. krusei* e *C. glabrata* (grupos Controle) e interação entre *C. krusei* com *C. glabrata* quando comparada aos grupos controles ( $p=0,7608$ ).

### 5.2.2 Contagem de UFC/mL de *Candida* na hemolinfa de *G. mellonella*

Através dos resultados obtidos verificou-se haver um comportamento semelhante no crescimento de *C. albicans* tanto na infecção monotípica quanto heterotípica nos tempos de 0, 4 e 8 h. (Tabela 3). Apenas no tempo de 12 h da infecção foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (Figura 7). Para a espécie de *C. albicans*, não foi realizado a contagem de leveduras na hemolinfa de *G. mellonella* nos tempos de 18 e 24 h, pois nesses tempos todas as lagartas já estavam mortas.

Tabela 3 - Média e desvio-padrão dos números de UFC/mL de *C. albicans* (Log) obtidos nos diferentes ensaios experimentais

Tempo (h)	<i>C. albicans</i> (Infecção monotípica)	Interação com <i>C. glabrata</i>	Interação com <i>C. krusei</i>	Valor de $p^*$
0	5,35 ± 0,07	5,29 ± 0,09	5,35 ± 0,11	0,684
4	4,54 ± 0,47	4,51 ± 0,12	4,56 ± 0,08	0,971
8	4,85 ± 0,04	4,61 ± 0,19	4,81 ± 0,08	0,114
12	5,28 ± 0,10	4,78 ± 0,06	5,01 ± 0,06	0,005

\*Valor de  $p$  obtido na comparação dos grupos experimentais (Teste ANOVA,  $p \leq 0,05$ )

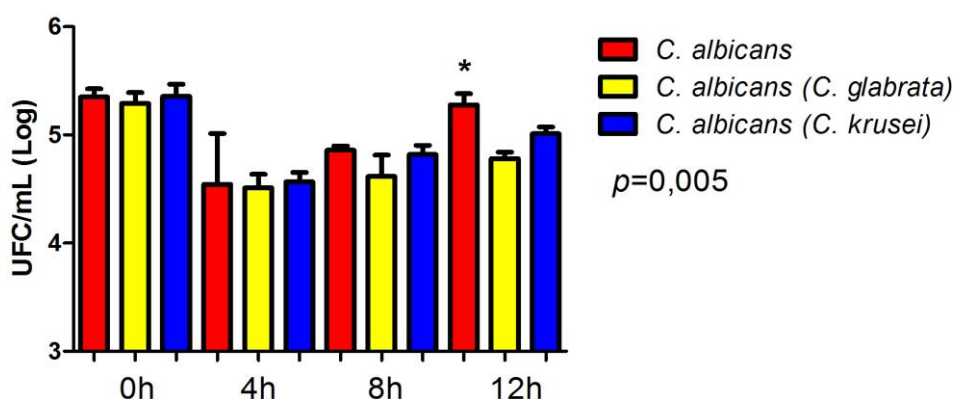


Figura 7 - Média e desvio padrão ( $\text{Log}_{10}$ ) dos diferentes grupos experimentais nos tempos de 0, 4, 8 e 12 h. Verifica-se o comportamento semelhante dos grupos em relação ao crescimento de *C. albicans* nos diferentes tempos da infecção exceto para o tempo de 12 h.

Com base na figura 7 e nos dados da tabela acima podemos verificar que no tempo de infecção de 12 h, *C. albicans* apresentou um crescimento significativamente menor na interação quando comparado com o grupo controle, sugerindo que entre *C. albicans* e as espécies não-*albicans* há uma relação de competição. Esses dados podem explicar a maior sobrevivência das lagartas nos ensaios de sobrevivência dos grupos interação em relação ao grupo monotípico.

Para a espécie de *C. glabrata*, através dos resultados obtidos verificou-se crescimento semelhante tanto na infecção monotípica quanto heterotípica nos tempos de 0, 4, 8, 12, e 18 h (Tabela 4). Apenas no tempo de 24 h da infecção foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (Figura 8).

Tabela 4 - Média e desvio-padrão dos números de UFC/mL de *C. glabrata* (Log) obtidos nos diferentes ensaios experimentais

Tempo (h)	<i>C. glabrata</i> (Infecção monotípica)	Interação com <i>C. albicans</i>	Valor de $p^*$
0	5,24 ± 0,05	5,23 ± 0,05	0,880
4	4,21 ± 0,06	4,12 ± 0,44	0,735
8	4,38 ± 0,07	3,74 ± 0,54	0,113
12	4,02 ± 0,20	4,07 ± 0,37	0,847
18	4,23 ± 0,01	3,69 ± 0,41	0,089
24	4,02 ± 0,02	3,48 ± 0,35	0,008

\*Valor de  $p$  obtido na comparação dos grupos experimentais (Teste  $t$  de Student,  $p \leq 0,05$ )

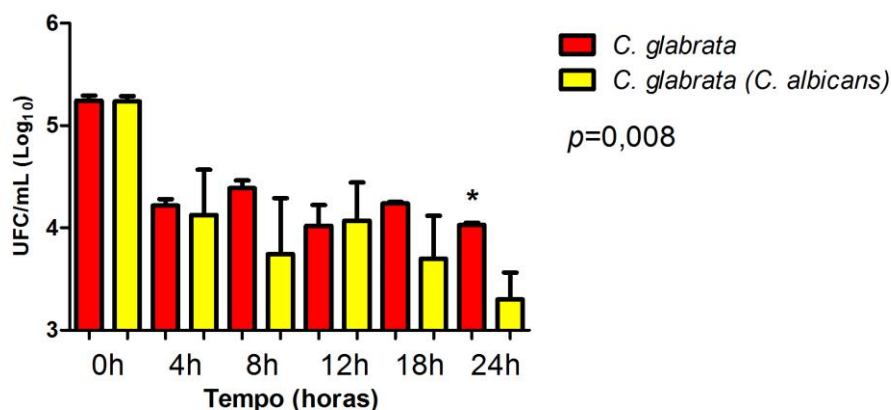


Figura 8 - Média e desvio padrão ( $\text{Log}_{10}$ ) dos diferentes grupos experimentais nos tempos de 0, 4, 8, 12, 18 e 24 h. Verifica-se o comportamento semelhante dos grupos em relação ao crescimento de *C. glabrata* nos diferentes tempos da infecção exceto para o tempo de 24 h.

Com base na figura 8 e nos dados da tabela acima podemos verificar que no tempo de infecção de 24 h, *C. glabrata* apresentou um crescimento significativamente menor na interação quando comparado com o grupo controle. Também pode-se verificar que na infecção monotípica, o sistema imunológico das lagartas consegue controlar e manter a UFC/mL de *C. glabrata* após 4 h de infecção, esse dado pode explicar a maior sobrevivência das lagartas nos ensaios de sobrevivência dessa espécie em relação a *C. albicans*.

Já para *C. krusei*, através dos resultados obtidos verificou-se crescimento semelhante tanto na infecção monotípica quanto heterotípica nos tempos de 0, 4 e 8 h. (Tabela 5). Nos tempos de 12, 18 e 24 h da infecção foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (Figura 9).

Tabela 5 - Média e desvio-padrão dos números de UFC/mL de *C. krusei* (Log) obtidos nos diferentes ensaios experimentais

Tempo (h)	<i>C. krusei</i> (Infecção monotípica)	Interação com <i>C. albicans</i>	Valor de $p^*$
0	5,38 ± 0,24	5,25 ± 0,20	0,496
4	4,57 ± 0,13	4,64 ± 0,21	0,672
8	4,33 ± 0,27	4,08 ± 0,14	0,245
12	4,51 ± 0,13	4,01 ± 0,23	0,032
18	4,56 ± 0,06	3,93 ± 0,05	0,0002
24	4,52 ± 0,13	3,91 ± 0,18	0,009

\*Valor de  $p$  obtido na comparação dos grupos experimentais (Teste  $t$  de Student,  $p \leq 0,05$ )

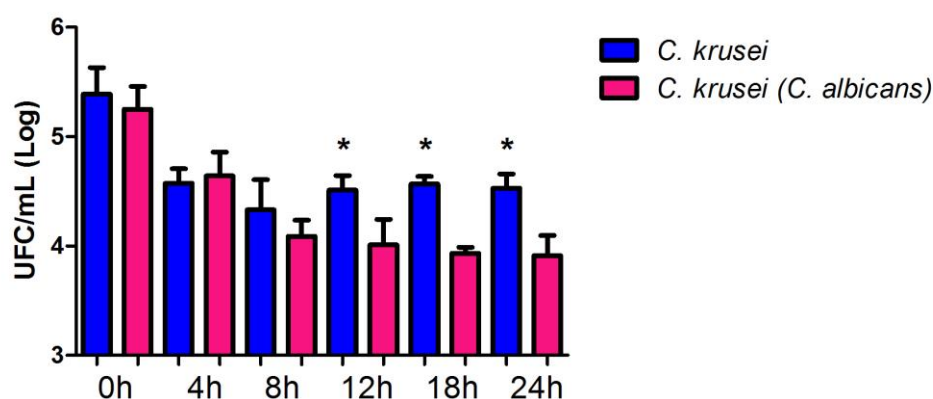


Figura 9 - Média e desvio padrão ( $\text{Log}_{10}$ ) dos diferentes grupos experimentais nos tempos de 0, 4, 8, 12, 18 e 24 h. Verifica-se o comportamento semelhante dos grupos em relação ao crescimento de *C. krusei* nos diferentes tempos da infecção exceto para os tempos de 12, 18 e 24h.

Com base na figura 9 e nos dados da tabela acima podemos verificar que nos tempo de infecção de 12, 18 e 24 h, *C. krusei* apresentou um crescimento significamente menor na interação quando comparado com o grupo controle. Pode-se verificar que na infecção monotípica, o sistema imunológico das lagartas conseguiu controlar e

manter a UFC/mL de *C. krusei* após 4 h de infecção, esse dado pode explicar a maior sobrevivência das lagartas nos ensaios de sobrevivência dessa espécie em relação a *C. albicans*.

Em relação à interação entre as espécies não-*albicans*, para *C. krusei*, verificou-se crescimento semelhante tanto na infecção monotípica quanto heterotípica nos tempos de 0, 8, 18 e 24 h, entretanto foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos tempos 4 ( $p=0,007$ ) e 12 ( $p=0,019$ ) h da infecção (Figura 10). Já para *C. glabrata*, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos tempos de 4 ( $p=0,003$ ), 8 ( $p=0,001$ ) e 18 ( $p=0,001$ ) h da infecção (Figura 11).

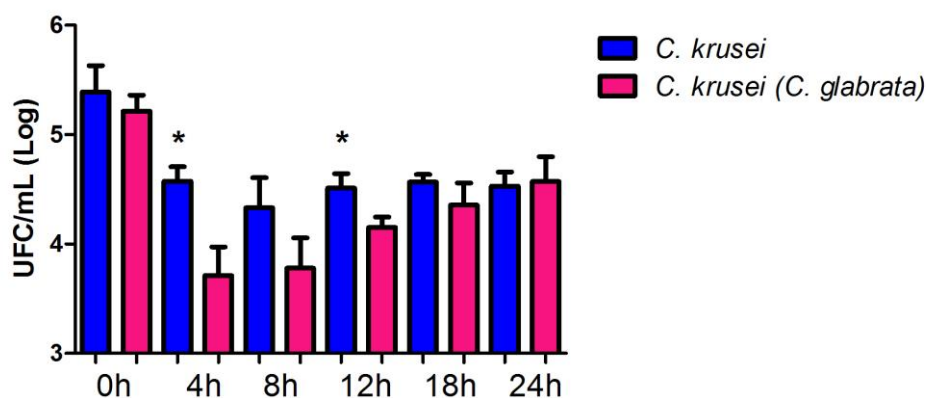


Figura 10 - Média e desvio padrão ( $\text{Log}_{10}$ ) dos diferentes grupos experimentais nos tempos de 0, 4, 8, 12, 18 e 24 h. Verifica-se o comportamento semelhante dos grupos em relação ao crescimento de *C. krusei* nos diferentes tempos da infecção exceto para os tempos de 4 e 12 h.

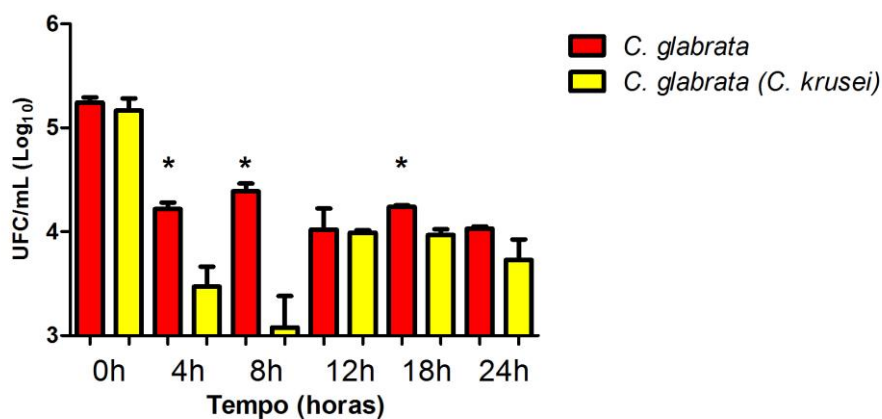


Figura 11 - Média e desvio padrão ( $\text{Log}_{10}$ ) dos diferentes grupos experimentais nos tempos de 0, 4, 8, 12, 18 e 24 h. Verifica-se o comportamento semelhante dos grupos em relação ao crescimento de *C. glabrata* nos diferentes tempos da infecção exceto para os tempos de 4, 8 e 18 h.

### 5.3 Estudo das interações microbianas em modelo de camundongo imunossuprimido

#### 5.3.1 Recuperação de *Candida* da cavidade bucal dos camundongos

Foram analisados os dados de UFC/mL da recuperação de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* da cavidade bucal dos camundongos com candidose induzida por suspensões de *Candida* homotípicas ou heterotípicas (Figuras 12 e 13). Inicialmente, todos os dados foram submetidos à análise estatística descritiva conforme demonstrado nas Tabelas 6 e 7.

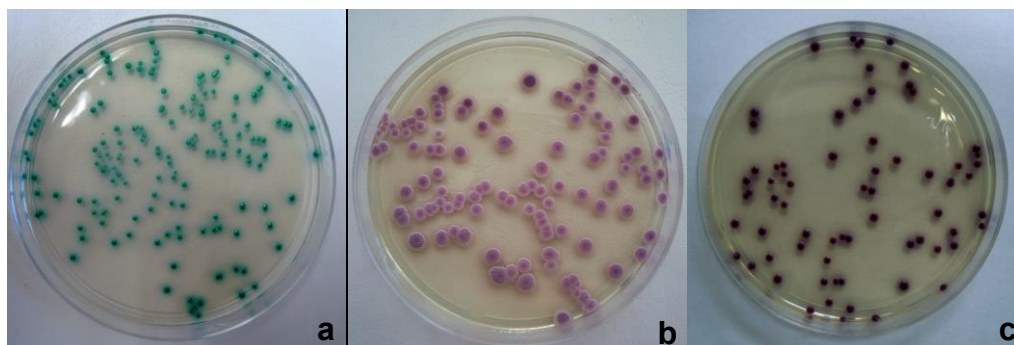


Figura 12 - Unidades formadoras de colônias nas infecções monotípicas em meio de cultura HiCrome *Candida*: a) *C. albicans*; b) *C. krusei*; c) *C. glabrata*.

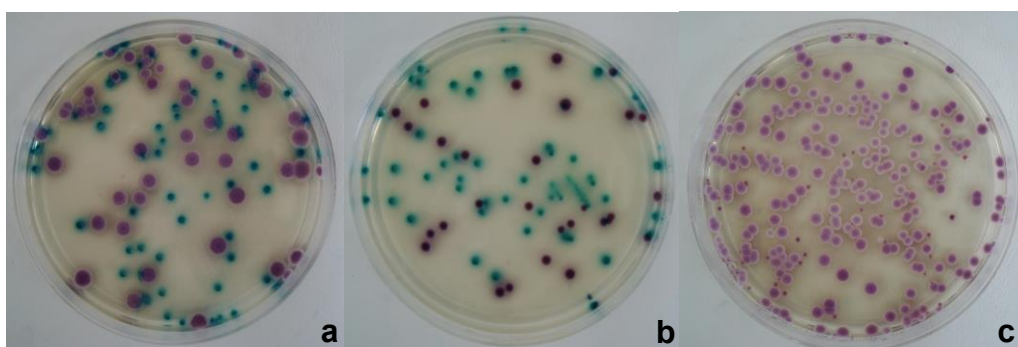


Figura 13 - Unidades formadoras de colônias nas infecções heterotípicas em meio de cultura HiCrome *Candida*: a) *C. albicans* e *C. krusei*; b) *C. albicans* e *C. glabrata*; c) *C. krusei* e *C. glabrata*.

Tabela 6 - Estatística descritiva dos valores de UFC/mL (Log) obtidos na contagem de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* da cavidade bucal dos camundongos com candidose monoespécie (grupos controle)

<b>Espécies</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>
<i>C. albicans</i>	5,757	0,319	5,057	5,838	6,073
<i>C. krusei</i>	6,182	0,065	6,076	6,193	6,292
<i>C. glabrata</i>	4,338	0,184	4,114	4,341	4,663

DP: desvio-padrão

Tabela 7 - Estatística descritiva dos valores de UFC/mL (Log) obtidos na contagem de *C. albicans* e *C.krusei*, *C. albicans* e *C. glabrata* e *C. glabrata* e *C. krusei* da cavidade bucal dos camundongos com candidose multiespécie (grupo interação)

Interação	Espécie	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
<i>C. albicans</i> e	<i>C.albicans</i>	5,321	0,294	4,833	5,460	5,602
<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	5,712	0,349	4,903	5,866	5,948
<i>C. albicans</i> e	<i>C.albicans</i>	5,466	0,296	4,924	5,471	5,956
<i>C. glabrata</i>	<i>C.glabrata</i>	3,856	0,247	3,301	3,900	4,079
<i>C. glabrata</i> e	<i>C.glabrata</i>	3,379	0,461	2,602	3,540	3,903
<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	6,200	0,049	6,123	6,204	6,274

DP: desvio-padrão

Nos animais com infecção monoespécie foram observadas recuperações de  $5,75 \pm 0,31$  UFC/mL (Log) para o grupo infectado por *C. albicans*,  $6,18 \pm 0,06$  UFC/mL (Log) para o grupo inoculado com *C. krusei* e  $4,33 \pm 0,18$  UFC/mL (Log) para o grupo com *C. glabrata*, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,0001$ ). Esses dados indicaram que *C. krusei* apresentou maior capacidade em colonizar a cavidade bucal dos camundongos imunossuprimidos do que as espécies *C. albicans* e *C. glabrata*.

Analisando o perfil de colonização de *C. albicans* em infecção monoespécie e multiespécie, verificou-se que a contagem de UFC/mL foi menor em ambas as infecções multiespécies, com  $5,32 \log_{10}$  para *C. albicans/C. krusei* ( $p=0,012$ ) e  $5,46 \log_{10}$  para *C. albicans/C.glabrata* ( $p=0,079$ ) em relação à infecção monoespécie ( $5,75 \pm 0,31$ ), sendo, portanto observada diferença estatisticamente significativa apenas para a associação *C. albicans/C. krusei*. As espécies não-*albicans* apresentaram o mesmo perfil de colonização, para *C. krusei* foi observado crescimento de  $6,18 \log_{10}$  na infecção monoespécie e  $5,71 \log_{10}$  na infecção multiespécie ( $p=0,008$ ). Já para a espécie *C. glabrata* foi

recuperado  $4,33 \log_{10}$  nas infecções monoespécies e  $3,85 \log_{10}$  na infecção multiespécie ( $p=0,001$ ). De acordo com os resultados apresentados, podemos verificar que ambas as espécies apresentaram um menor crescimento na interação quando comparadas com o grupo controle (Figura 14 e 15), sugerindo que entre *C. albicans* e as espécies não-*albicans* há uma relação de competição.

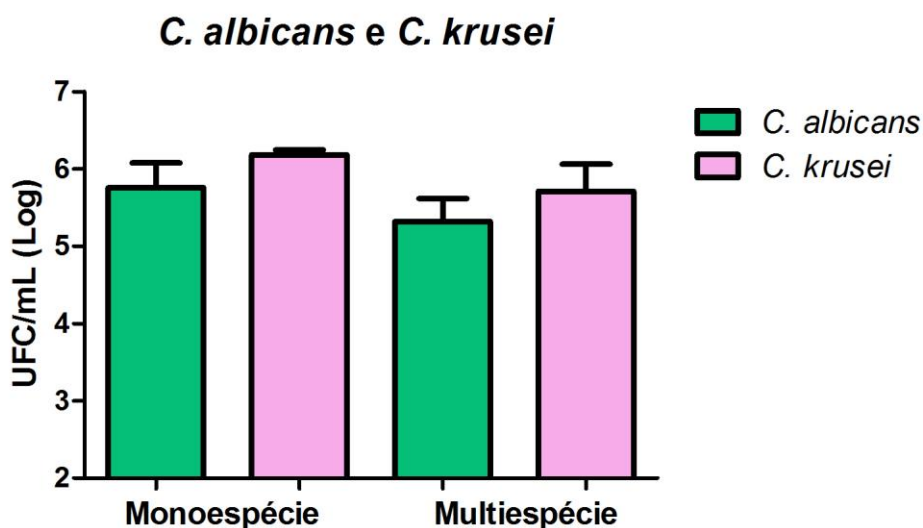


Figura 14 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de *C. albicans* e *C. krusei* quando em infecção monoespécie e multiespécie na cavidade bucal de camundongos imunossuprimidos. Teste *t* de Student: *C. albicans* na infecção monoespécie e *C. albicans* na infecção multiespécie ( $p=0,012$ ); *C. krusei* na infecção monoespécie e *C. krusei* na infecção multiespécie ( $p=0,008$ ).

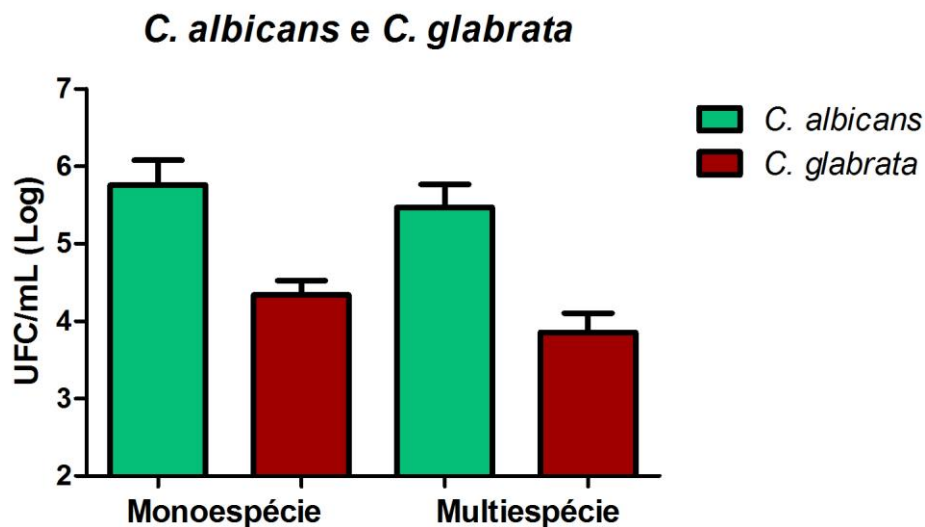


Figura 15 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de *C. albicans* e *C. glabrata* quando em infecção monoespécie e multiespécie na cavidade bucal de camundongos imunossuprimidos. Teste *t* de Student: *C. albicans* na infecção monoespécie e *C. albicans* na infecção multiespécie ( $p=0,079$ ); *C. glabrata* na infecção monoespécie e *C. glabrata* na infecção multiespécie ( $p=0,001$ ).

Para a interação entre as espécies não-*albicans*, *C. krusei* em infecção monoespécie e multiespécie, verificou-se que a contagem de UFC/mL foi semelhante ( $6,20 \pm 0,04$ ) em relação ao grupo monoinfecção ( $6,18 \pm 0,06$ ), sem diferença significativa ( $p= 0,552$ ). *C. glabrata* foi recuperado  $4,33 \log_{10}$  nas infecções monoespécies e  $3,37 \log_{10}$  na infecção multiespécie ( $p=0,0001$ ). Esses dados sugerem que o crescimento de *C. krusei* não é afetado pela presença de *C. glabrata*. No entanto, *C. glabrata* apresentou menor crescimento na interação quando comparada com o grupo monotípico (Figura 16).

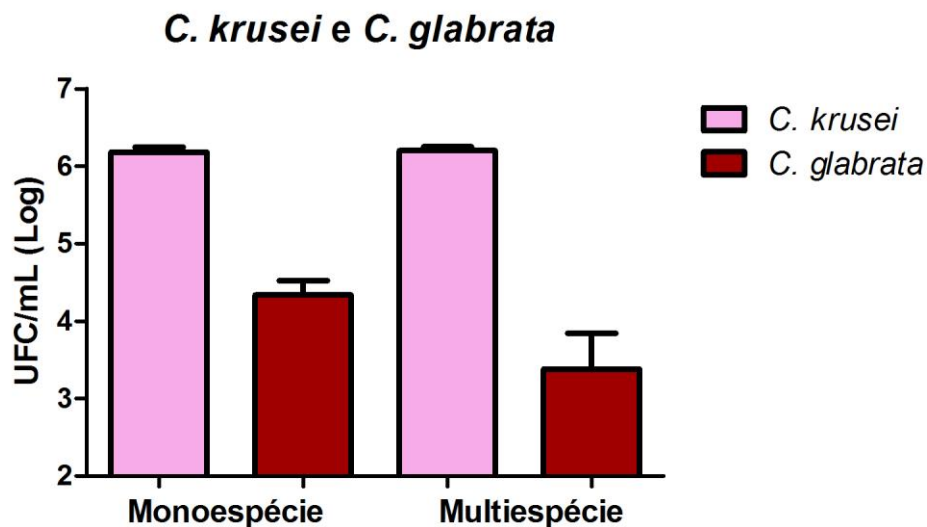


Figura 16 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem de *C. krusei* e *C. glabrata* quando em infecção monoespécie e multiespécie na cavidade bucal de camundongos imunossuprimidos. Teste *t* de Student: *C. krusei* na infecção monoespécie e *C. krusei* na infecção multiespécie ( $p=0,552$ ); *C. glabrata* na infecção monoespécie e *C. glabrata* na infecção multiespécie ( $p=0,0001$ ).

### 5.3.2 Análise Macroscópica da infecção de *Candida* no dorso da língua

A análise macroscópica revelou que em todos os grupos inoculados com suspensões de *C. albicans*, tanto monotípicos quanto heterotípicos, apresentaram lesões de candidose sobre o dorso da língua. Essas lesões foram caracterizadas por regiões esbranquiçadas com áreas de atrofia papilar ou com presença de pseudomembrana (Figuras 17 - 20). O valor da mediana para o grupo monotípico de *C. albicans* foi maior que os grupos com infecções mistas com espécies não *albicans*, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,087$ ). Tanto para os grupos monotípicos e heterotípicos com as espécies de *C. krusei* e *C. glabrata*, não foram observadas lesões características de candidose no dorso da língua dos animais,

sugerindo que essas espécies emergentes foram capazes apenas de colonizar a cavidade bucal dos camundongos (Figura 21).

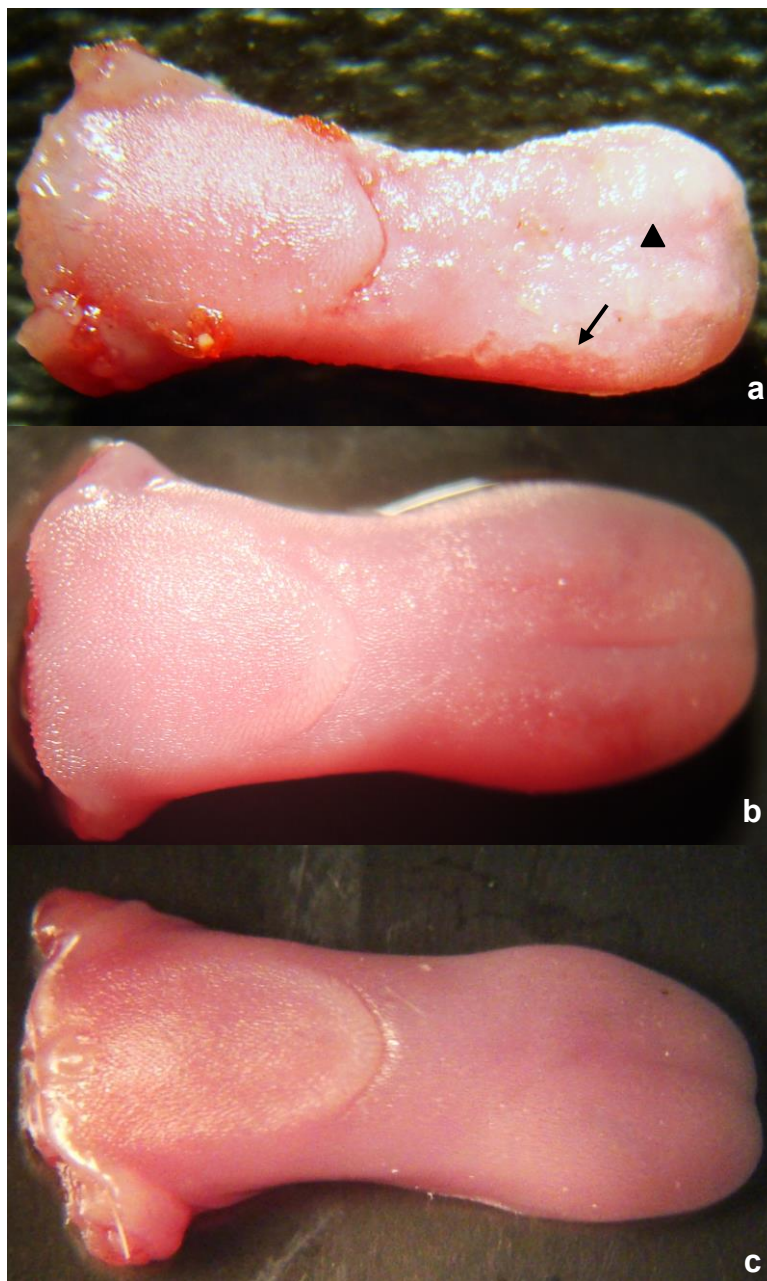


Figura 17 - Aspecto das lesões das línguas dos camundongos inoculadas com suspensões monoespécies de: a) *C. albicans*; b) *C. krusei*; c) *C. glabrata*, com presença de regiões esbranquiçadas (▲) e atrofia papilar (↓).

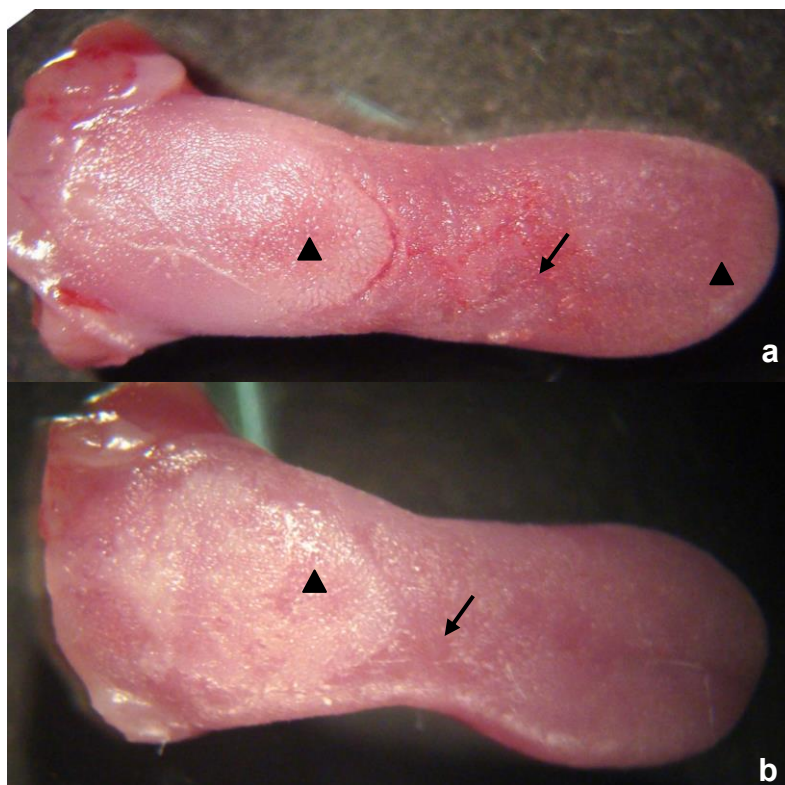


Figura 18 - Aspecto das lesões das línguas dos camundongos inoculadas com suspensões multiespécies de: a) *C. albicans* e *C. krusei*; b) *C. albicans* e *C. glabrata*, com presença de regiões esbranquiçadas (▲) e atrofia papilar (↓).



Figura 19 - Lesão de candidose no dorso da língua do camundongo inoculado com *C. albicans*, caracterizada por regiões esbranquiçadas e formação de pseudomembranas.



### 5.3.3 Análise microscópica de *Candida* no dorso da língua

A análise microscópica foi feita pela quantificação de leveduras e hifas, alterações epiteliais e a extensão do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo.

Nas lesões de candidose foram observadas leveduras e hifas limitadas à camada queratinizada do dorso da língua, concentradas principalmente nas papilas cônicas simples e, às vezes, espalhadas. Quando havia maior concentração de *Candida*, notavam-se a presença de leucócitos polimorfonucleares no epitélio formando microabscessos intraepiteliais e a presença de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo.

A presença de leveduras e hifas foi quantificada em 23 campos histológicos para cada animal, o grupo inoculado apenas com *C. albicans* obteve maior quantidade de leveduras e hifas do que na associação com *C. krusei* ( $p=0,0051$ ) e *C. glabrata* ( $p=0,0008$ ), com diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, o que demonstra maior patogenicidade de *C. albicans* quando em infecção monotípica. Já para os grupos inoculados com suspensões monotípicas de *C. krusei* e *C. glabrata* não foram encontrados hifas e/ou leveduras, concordando com os resultados macroscópicos desse trabalho, os quais demonstraram que essas espécies não-*albicans* não foram capazes de causar infecção no modelo proposto, sendo capazes apenas de colonizar a cavidade bucal dos camundongos (Figura 22-28).

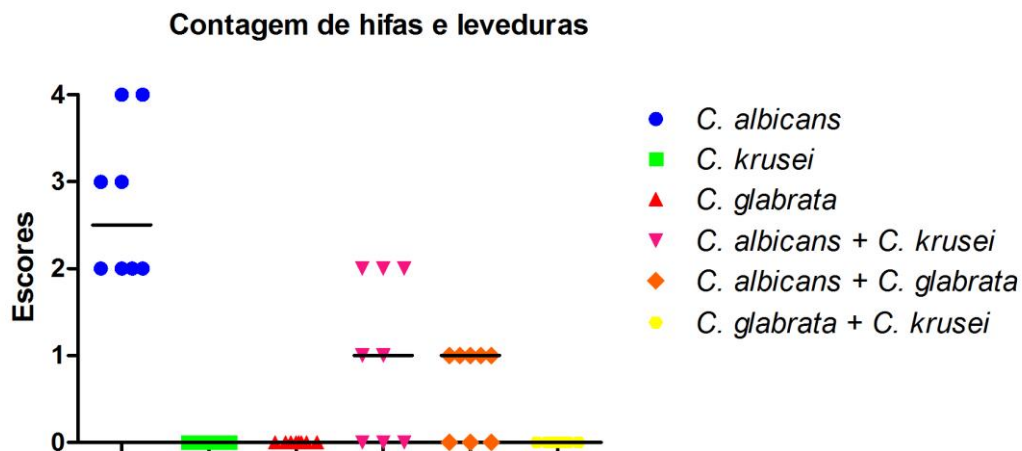


Figura 22 - Escores e mediana da contagem de hifas e leveduras nos 23 campos histológicos analisados para *C. albicans* e os grupos multiespécies.

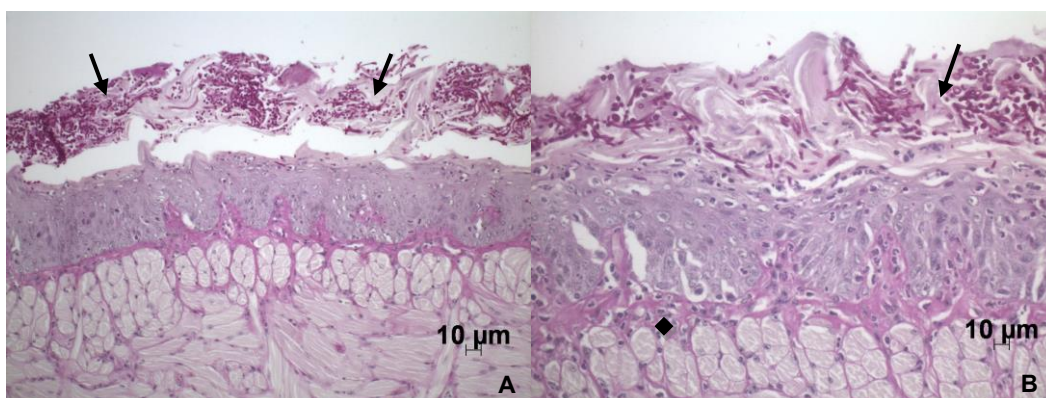


Figura 23 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo controle de *C. albicans*, observando-se leveduras e hifas (↓) na queratina e células inflamatórias na lâmina própria (◆). PAS; aumento original: 200X (A) e 400X (B).

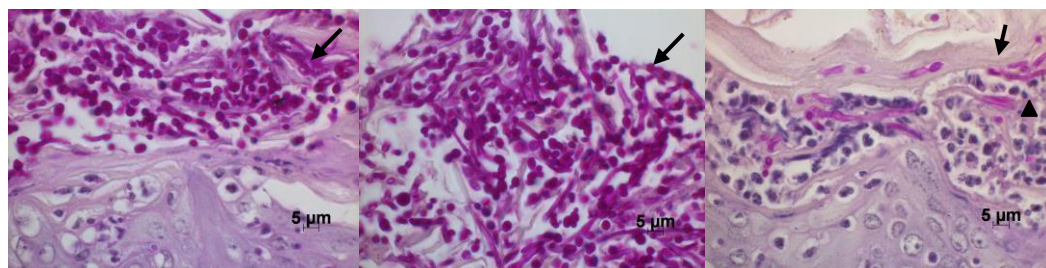


Figura 24 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo controle de *C. albicans*, observando-se leveduras e hifas (↓) na queratina e formação de microabscessos (▲). PAS; aumento: 630X.

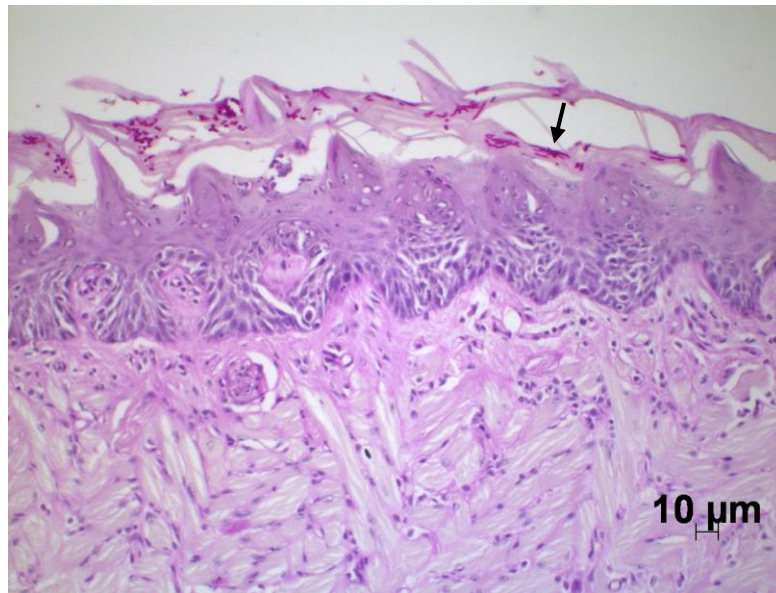


Figura 25 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo interação de *C. albicans* e *C. krusei*, observando-se leveduras e hifas (↓) na queratina. PAS; aumento: 200X.

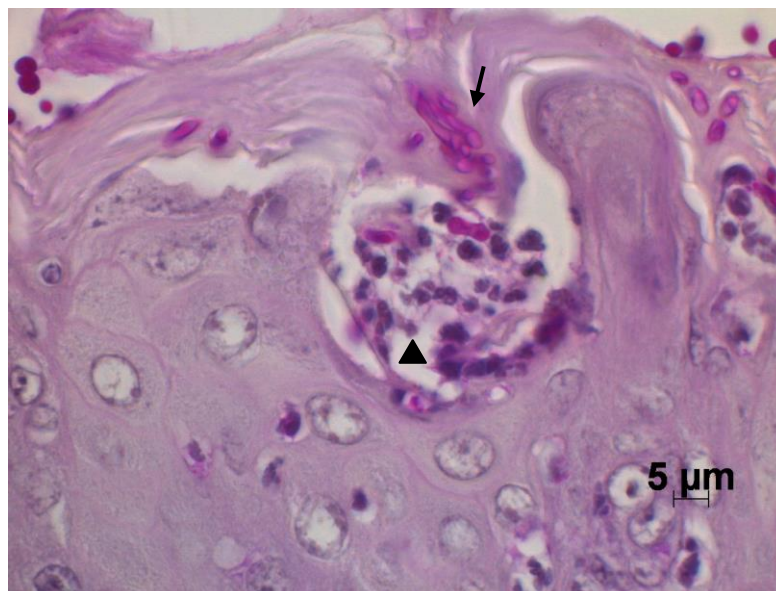


Figura 26 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo interação de *C. albicans* e *C. krusei*, observando-se leveduras e hifas (↓) na queratina e formação de microabcesso intraepitelial (▲). PAS; aumento: 630X.

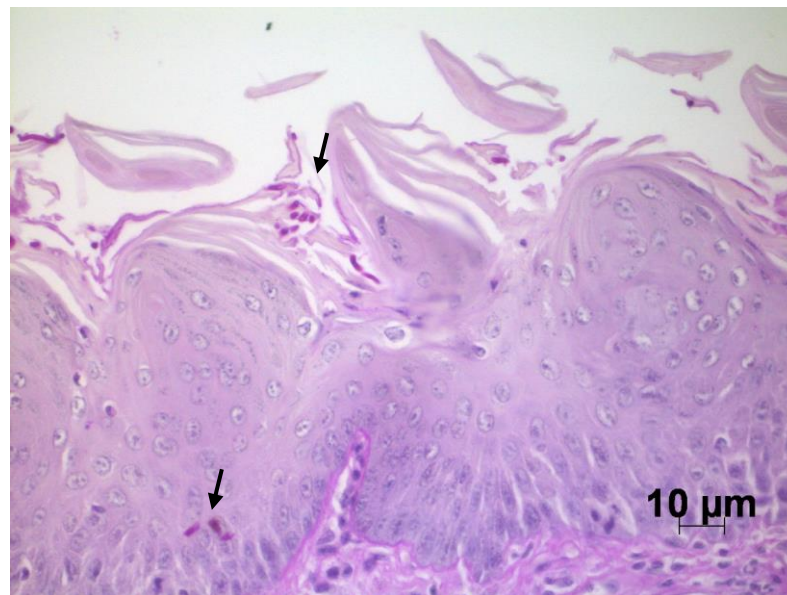


Figura 27 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo interação de *C. albicans* e *C. glabrata*, observando-se leveduras e hifas (↓) na queratina e no epitélio. PAS; aumento: 400X.

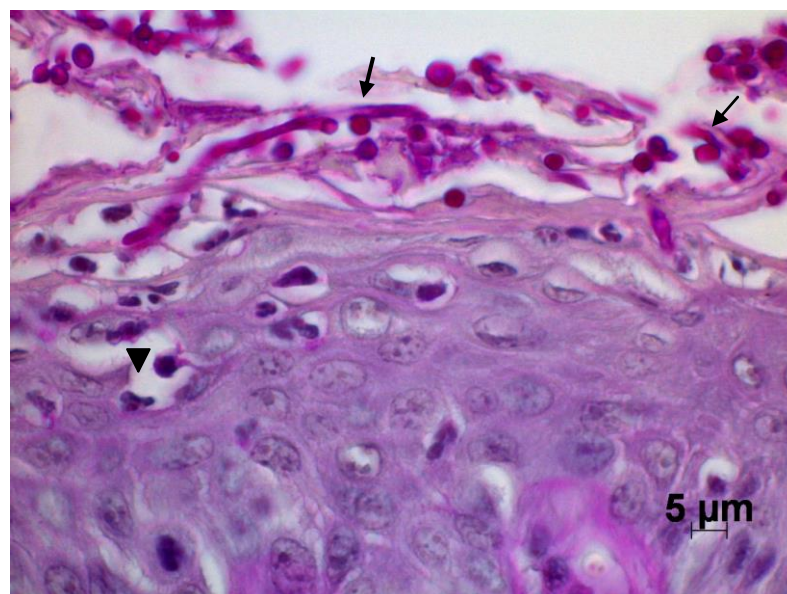


Figura 28 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo interação de *C. albicans* e *C. krusei*, observando-se leveduras e hifas (↓) na queratina e células inflamatórias no epitélio (▼). PAS; aumento: 630X.

As alterações epiteliais foram quantificadas, revelando numerosas lesões do epitélio como descamação, perda das papilas filiformes, perda da estratificação, hiperplasia epitelial, exocitose, espongirose, acantólise, hiperqueratose, desorganização da camada basal e formação de microabscessos intraepiteliais. O grupo monotípico de *C. albicans* exibiu maior número de lesões teciduais do que os demais grupos, seguida pelas associações com *C. glabrata* ( $p=0,0041$ ) e *C. krusei* ( $p=0,0014$ ), havendo diferença estatisticamente significativa (Figura 29 - 35). Já para os grupos inoculados com suspensões monotípicas de *C. krusei* e *C. glabrata* foram quantificadas poucas alterações epiteliais em relação aos demais grupos.

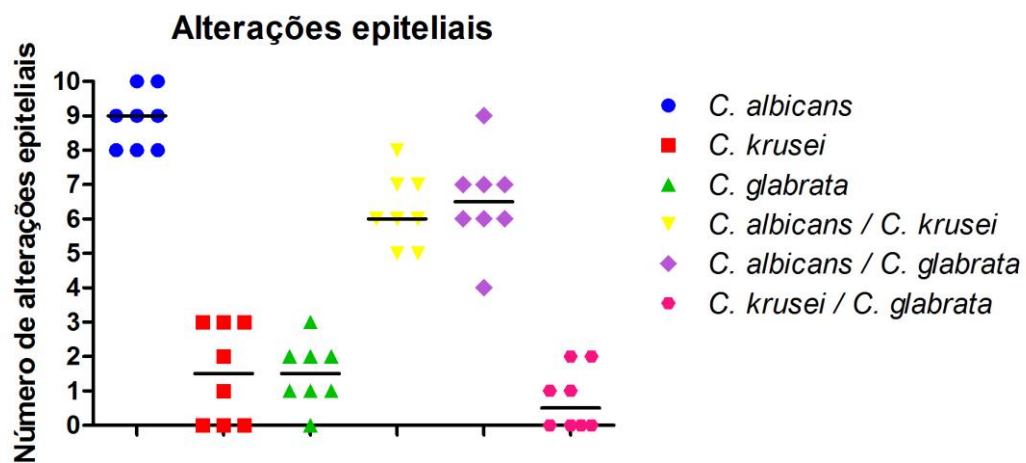


Figura 29 - Número de alterações epiteliais e medianas observadas nas lesões microscópicas de candidose no dorso da língua dos camundongos inoculadas com suspensões de *Candida* monoespécies e multiespécies.

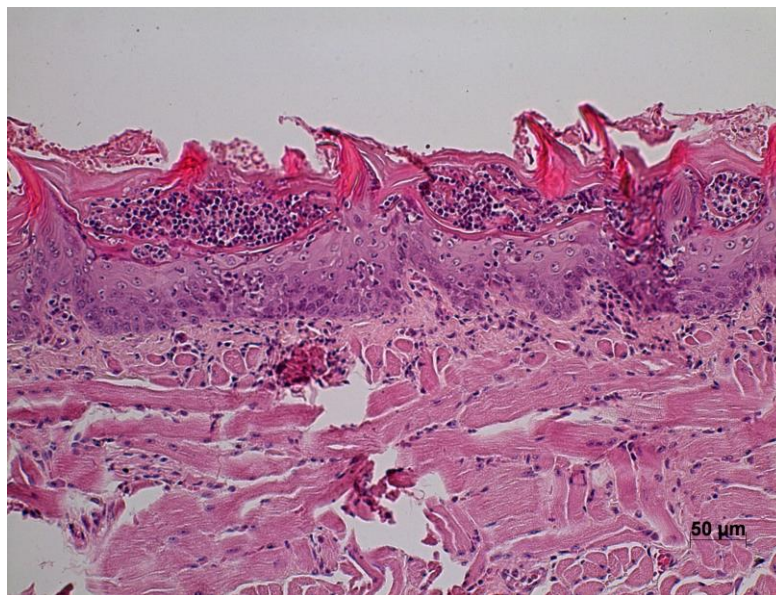


Figura 30 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo controle de *C. albicans*, observando-se a presença de microabscessos intraepiteliais, excitose, espongiose. Na lâmina própria observa-se infiltrado inflamatório moderado. HE; aumento: 200X.

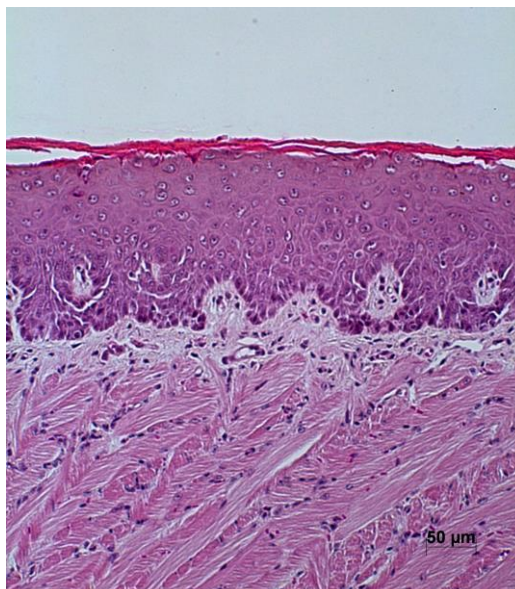


Figura 31 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo controle de *C. albicans*, observando-se a presença de espongiose e atrofia da camada córnea do epitélio. Na lâmina própria observa-se infiltrado inflamatório leve. HE; aumento: 200X.

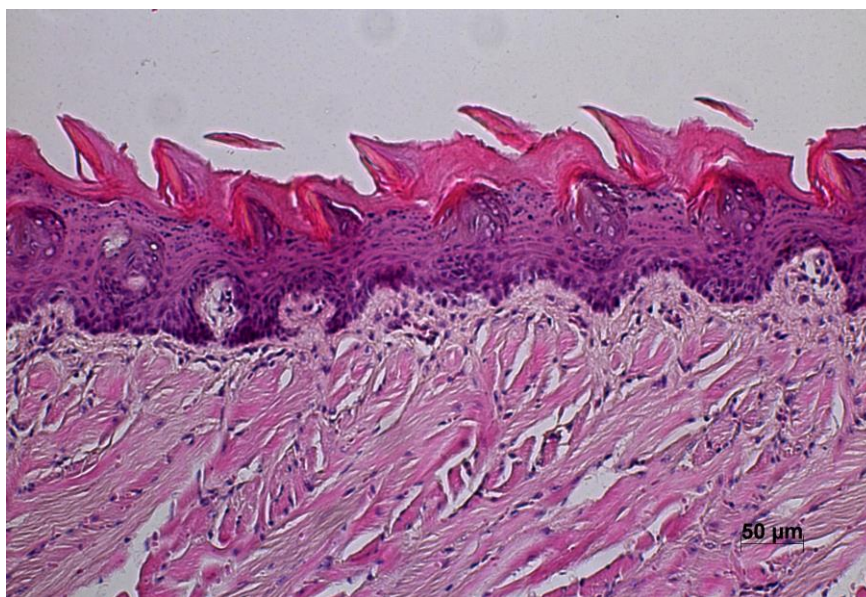


Figura 32 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo controle de *C. krusei*, observando-se aspecto de normalidade do tecido. HE; aumento: 200X.

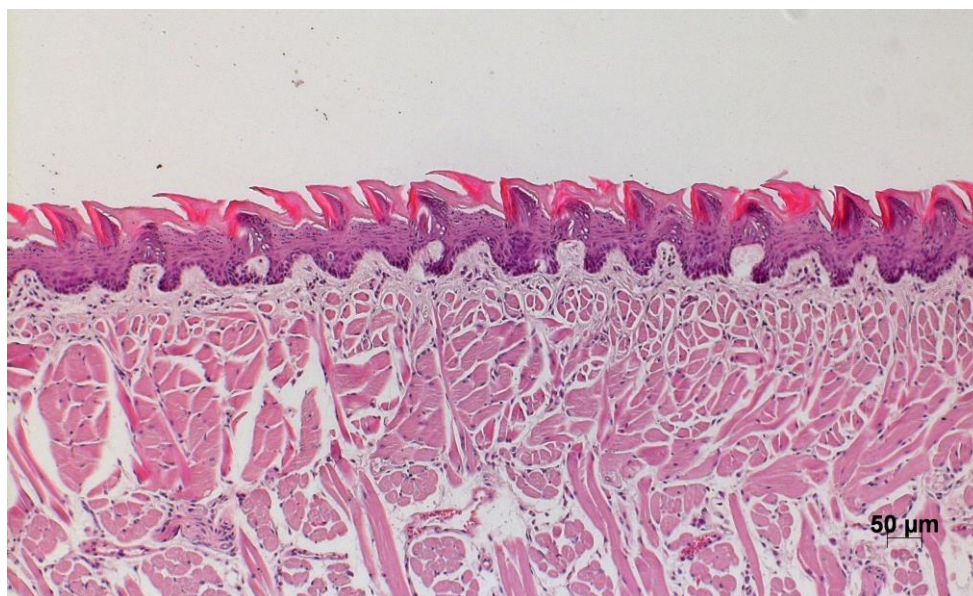


Figura 33 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo controle de *C. glabrata*, observando-se aspecto de normalidade do tecido. HE; aumento: 100X.

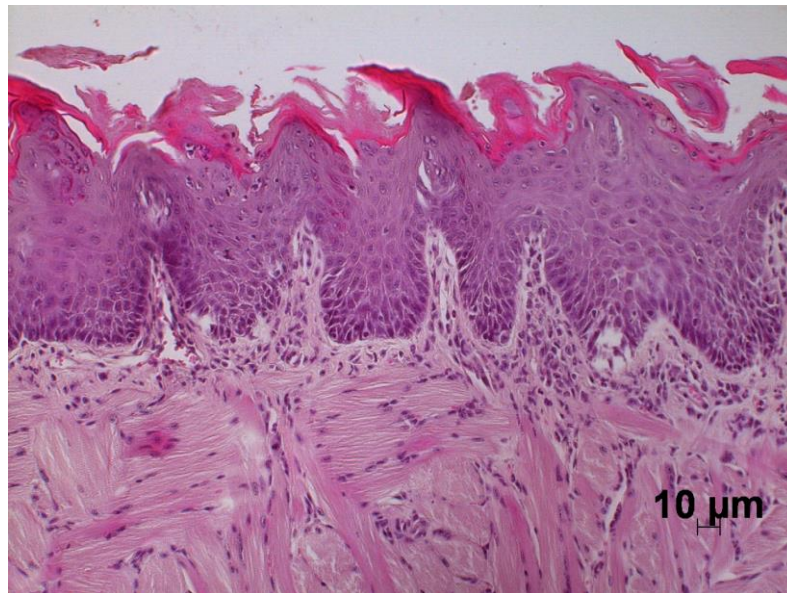


Figura 34 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo interação de *C. albicans* e *C. krusei*, observando-se a presença de espongiose, duplicação da camada basal, hiperplasia e descamação epitelial. Na lâmina própria observa-se infiltrado inflamatório moderado. HE; aumento: 200X.

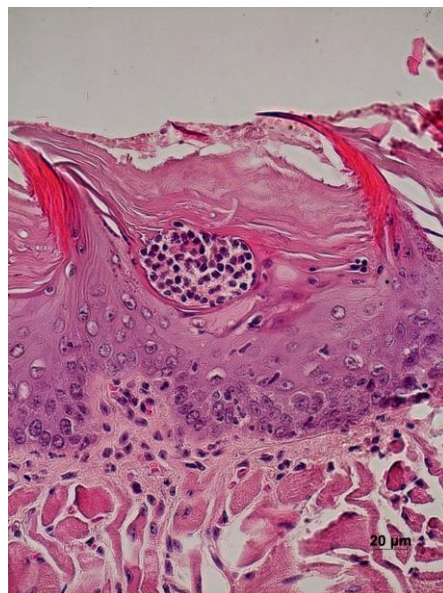


Figura 35 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos do grupo interação de *C. albicans* e *C. glabrata*, observando-se a presença de microabcesso intraepitelial. Na lâmina própria observa-se infiltrado inflamatório leve. HE; aumento: 400X.



## 6 DISCUSSÃO

O conhecimento a respeito da natureza e do desenvolvimento de biofilmes microbianos vem crescendo desde o primeiro relatório escrito por Antonie van Leeuwenhoek no final de 1600. No entanto, a maioria desses estudos são em culturas com uma única espécie, ao passo que quase todas as comunidades de biofilme na natureza incluem uma variedade de micro-organismos. Em uma comunidade microbiana heterogênea existe a comunicação através de *quorum sensing*, e a interação entre as espécies podem ser antagônicas, como a competição por mais nutrientes e consequente inibição do crescimento, ou sinérgicas levando ao mútuo crescimento (Elias, Banin 2012).

Existe um consenso na comunidade científica que o aumento na incidência de candidoses durante as décadas de 80 e 90 levaram essa levedura a ser a quarta maior causa de infecção sistêmica nos Estados Unidos (Kourkoumpetis et al. 2010). Além disso, houve um aumento significativo na colonização e infecção de espécies não-*albicans* em pacientes com as mais diversas patologias. Esses dados nos mostram a razão do desenvolvimento de modelos experimentais de infecções mistas por diferentes espécies de *Candida* afim de compreender melhor as relações ecológicas dessas espécies e possibilitar o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas nos casos de infecções polimicrobianas (Bandara et al., 2010; Majithiya et al., 2009).

Embora seja estabelecido na literatura que os biofilmes contendo diferentes espécies de *Candida* são importantes para o desenvolvimento da candidose bucal, poucos trabalhos foram realizados para estudar as características dos biofilmes multiespécies de *Candida*.

Nesse estudo de acordo com os resultados obtidos, na contagem de UFC/mL dos biofilmes formados *in vitro*, foi demonstrado que *C. albicans* apresentou um menor crescimento em biofilmes heterotípicos quando comparado com o grupo monotípico, sugerindo que entre *C. albicans* e as espécies não-*albicans* há uma relação de competição. Esses resultados concordam com Thein et al. (2007) que estudaram a interação *in vitro* entre *C. albicans* e *C. krusei*. Os autores observaram uma competição entre essas duas espécies com redução de 85% no crescimento de *C. albicans*. Piva (2012) também avaliaram as interações de *C. albicans* com *C. glabrata* e *C. krusei* em biofilmes formados *in vitro* por meio da contagem de UFC/mL. A autora observou que *C. albicans* estabeleceu relações favoráveis com *C. glabrata* e relações antagônicas com *C. krusei*. Em seu estudo, *C. albicans* formou 6,24 Log de UFC/mL no biofilme monotípico, mas quando cresceu em biofilme heterotípico com *C. krusei* formou apenas 0,40 Log de UFC/mL.

Para a interação entre as espécies não-*albicans*, *C. krusei* obteve crescimento maior quando associado com *C. glabrata* em relação ao grupo monoinfecção. No entanto, *C. glabrata* apresentou menor crescimento na interação quando comparada com o grupo monotípico. Esses dados sugerem que o crescimento de *C. krusei* foi estimulado pela presença de *C. glabrata*. Até o momento esse é o único estudo que avaliou a interação entre duas espécies não-*albicans*.

No presente estudo, foi induzida a candidose experimental em modelo invertebrado de *G. mellonella* e vertebrado em camundongos imunossuprimidos para o estudo *in vivo* das interações entre diferentes espécies de *Candida*. No modelo invertebrado, 100% das lagartas infectadas com suspensões homotípicas de *C. albicans* (grupo controle) morreram após 18 h de infecção. Já as espécies *C. krusei* e *C. glabrata* foram menos patogênicas às lagartas, apresentando taxa de mortalidade de 34 e 19% respectivamente em 96 h de infecção. Esses dados são convergentes com Cotter et al. (2000) e com o estudo de

Junqueira et al. (2011). Cotter et al. (2000) foi o pioneiro no estudo da patogenicidade de *Candida* em *G. mellonella*, os autores encontraram taxas de mortalidade semelhantes ao presente estudo. *C. albicans* foi à espécie mais patogênica causando morte em 90% das lagartas, enquanto que a taxa de mortalidade para as outras espécies foram de: 70% para *C. tropicalis*, 45% para *C. parapsilosis*, 45% para *C. pseudotropicalis*, 20% para *C. krusei* e 0% para *C. glabrata*. Junqueira et al. (2011) encontraram taxas de mortalidade em *G. mellonella* de 100% para *C. albicans*, 25% para *C. krusei* e 20% para *C. glabrata*. Espécies não-*albicans* apresentam menor patogenicidade no modelo de *G. mellonella*, segundo Scorzoni et al. (2013) para obter uma infecção letal com *C. krusei* em *G. mellonella* é necessário uma concentração de levedura 10 vezes maior que *C. albicans*.

Nos grupos de interação onde foram realizadas inoculações heterotípicas de *Candida* pode-se observar um aumento na taxa de sobrevivência de *G. mellonella* em relação ao grupo controle de *C. albicans*. Na infecção mista por *C. albicans* e *C. krusei* foram necessárias 96 h de infecção para ocorrer 100% de morte dos animais e para o grupo de *C. albicans* com *C. glabrata* foram necessárias 72 h para atingir 100% de mortalidade, enquanto que na infecção monotípica por *C. albicans* ocorreu 100% de mortalidade após 18 h da infecção. Esses dados sugerem que entre *C. albicans* e as espécies não-*albicans* estudadas há uma relação de competição durante a infecção em *G. mellonella*. Esses resultados concordam com os valores de UFC/mL de *Candida* obtidos na formação *in vitro* dos biofilmes mistos estudados no presente trabalho.

Esse antagonismo entre *C. albicans* e *C. krusei* pode ser explicado por Korres et al. (2011) que estudaram a interação entre *C. krusei* e *Fusarium guttiforme*. *C. krusei* foi testado como agente alternativo no controle biológico da fusariose no abacaxi causada pelo fungo *F. guttiforme*. Segundo os autores, *C. krusei* foi capaz de fixar, lisar e ainda

causar deformações nas hifas de *F. guttiforme*. A fixação de leveduras nas hifas do patógeno tem sido descrito como um fator relacionado à competição por nutrientes e por consequência lise das hifas e rompimento de fungos filamentosos (Chaurasia et al. 2005). Starmer et al. (1992) se refere a esse tipo de interação como competição por interferência. Marquina et al. (2002) demonstraram que *C. krusei* libera toxinas killer que estão associadas ao dano da membrana celular, o que pode explicar a competição entre ela e outras espécies.

As relações entre *C. albicans* e *C. glabrata* foram competitivas no modelo *in vivo* de infecção experimental em *G. mellonella*, porém em estudos como Pathak et al. (2012) e Piva (2012) que *in vitro* avaliaram a interação entre essas espécies mostraram uma relação favorável entre ambas, já Silva et al. (2013) encontraram uma relação neutra entre essas espécies onde o número de células cultiváveis de cada espécie não foi afetada pela presença da outra. Até o presente momento, este é o primeiro estudo de interação microbiana em *G. mellonella* e a diferença encontrada entre nossos resultados como os estudos *in vitro* da literatura pode ser atribuída à cepa estudada, concentração do inóculo e principalmente à resposta do sistema imunológico das lagartas de *G. mellonella*.

O sistema imune dessas lagartas é constituído basicamente por duas respostas imunes, a resposta humoral que resulta na produção de peptídeos antimicrobianos solúveis, formação de melanina e coagulação, e a resposta celular baseada na ação de hemócitos que estão envolvidos em reações de defesa, incluindo a fagocitose. Estas respostas imunes são desencadeadas através do reconhecimento de micro-organismos por receptores específicos existentes em proteínas do hospedeiro (Kim et al., 2010).

Em relação à contagem de UFC/mL de *Candida* na hemolinfa de *G. mellonella* podemos verificar que ocorreu uma resposta imune da lagarta após a inoculação de *C. albicans*. O número de micro-

organismos que pôde ser recuperado a partir da hemolinfa das lagartas logo após a inoculação (tempo 0) não diferiu do número usado para iniciar a infecção, no entanto, após 4 h de infecção pode-se perceber a maior redução do número de células recuperadas. Após este tempo, provavelmente o sistema imonológico da lagarta não teve como combater a infecção e a contagem do número de micro-organismos foi aumentando gradativamente, sendo que, a maior contagem ocorreu no tempo de 12 h. Pode-se observar o mesmo comportamento do crescimento de *C. albicans* tanto nos grupos de interação como no controle, porém, é importante ressaltar que houve um crescimento significativamente menor de *C. albicans* no tempo de 12 h nos grupos de interação quando comparado ao controle. Com isto podemos sugerir que a presença das espécies não-*albicans* na infecção em *G. mellonella* torna a infecção menos letal quando comparado ao grupo controle e pode ser uma explicação a maior sobrevivência das lagartas nos ensaios de sobrevivência dos grupos interação em relação ao grupo monotípico.

Resultados semelhantes foram encontrados por Chibebe Junior et al. (2013) verificaram a patogenicidade de cepas de *E. faecium* em modelo de *G. mellonella*. Neste estudo foram utilizados os tempos de análise de 0, 2, 4, 8, 12 e 24 h após a infecção com dose de ( $10^7$  UFC/larva). Assim como em nosso experimento o número de bactérias que pôde ser recuperado a partir da hemolinfa das lagartas durante o primeiro tempo não diferiu do número usado no início da infecção. No entanto, durante as primeiras 2 h após a infecção a UFC/larva diminuiu, mostrando uma rápida ação do sistema imunológico. Após este tempo, provavelmente o sistema imonológico da lagarta não teve como combater a infecção e a contagem do número de micro-organismos foi aumentando gradativamente, sendo que, a maior contagem ocorreu no tempo de 24 h. Estes dados mostram que a mortalidade elevada pode estar associada com a proliferação de bactérias dentro do hospedeiro e, portanto, com uma deficiência da resposta do sistema imune para se defender contra a

infecção.

Para a contagem de UFC/mL das espécies não-*albicans* na hemolinfa das lagartas, pode-se verificar que na infecção monotípica, o sistema imunológico desses animais consegue diminuir e manter a carga fúngica de *Candida* após 4 h e durante todos os demais tempos avaliados. Esse dado pode explicar a menor taxa de mortalidade dessas espécies em relação a *C. albicans* nos ensaios de sobrevivência. Scorzoni et al. (2013) também verificaram a patogenicidade de *C. krusei* em modelo de *G. mellonella*. No seu estudo foi quantificada a carga fúngica nos tempos de 0, 1, 3 e 5 dias após a infecção com dose de  $10^6$  UFC/larva). Os autores verificaram que a carga fúngica aumentou no primeiro dia e se manteve até o quinto dia, concluindo que *C. krusei* mostra virulência reduzida em invertebrados e em mamíferos e carga fúngica significativamente menor em animais infectados em relação com espécies mais patogênicas, como *C. albicans*.

O modelo experimental de *G. mellonella* é recente e cada vez mais tem ganhado aceitação na comunidade científica (Junqueira et al. 2012a). Por outro lado, o modelo experimental de candidose em ratos e camundongos tem sido utilizado há muitos anos e já apresenta metodologias bem estabelecidas (Costa et al., 2013). Os resultados obtidos no presente estudo em relação aos grupos de infecções monotípicas com *C. albicans* e *C. krusei* em *G. mellonella* concordam com Anaisse et al. (1993) e Koga-ito et al. (2011), que estudaram a candidose hematogênica experimental em vertebrados com essas espécies. Anaisse et al. (1993) induziram candidose hematogênica experimental por suspensões monotípicas de *C. albicans* e *C. krusei*, em camundongos e compararam a patogenicidade das duas espécies. Os autores realizaram a curva de sobrevivência dos animais e verificaram 100% de mortalidade nas infecções por *C. albicans* e ausência de mortalidade nos animais infectados sistemicamente por *C. krusei*. Koga-ito et al. (2011) em um estudo semelhante ao anterior compararam a cinética de virulência e

infecção de *C. dubliniensis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* na candidose sistêmica em camundongos. Após 35 dias da inoculação, houve uma taxa de mortalidade de 90% dos animais infectados com *C. albicans*, 30% com *C. tropicalis*, 10% *C. dubliniensis* e 0% com *C. krusei*. Esses dados nos mostram a confiabilidade do modelo invertebrado de *G. mellonella*, e que este pode ser um possível substituto ao uso de vertebrados em alguns ensaios de patogenicidade.

Brennan et al. (2002) estudaram a patogenicidade de cepas de *Candida* mutantes para a filamentação nos modelos de *G. mellonella* e de ratos. Os autores demonstraram que a resposta à infecção nos insetos mostra semelhanças com a encontrada em mamíferos e abre a possibilidade de reduzir a necessidade de utilização de mamíferos para testar a virulência dos mutantes empregando invertebrados como um mecanismo de triagem. A capacidade de pesquisar um grande número de mutantes em um curto período de tempo utilizando *G. mellonella* é uma das vantagens do modelo em comparação com a utilização de modelos convencionais de vertebrados.

No presente estudo, também foi induzida a candidose bucal experimental em modelo de camundongos imunossuprimidos para o estudo das interações entre diferentes espécies de *Candida*. Na análise dos dados de UFC/mL da recuperação de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* da cavidade bucal dos animais com candidose induzida por suspensões de *Candida* homotípicas ou heterotípicas, foi observado na infecção monoespécie recuperação de  $5,75 \log_{10}$  para o grupo infectado por *C. albicans*,  $6,18 \log_{10}$  para o grupo inoculado com *C. krusei* e  $4,33 \log_{10}$  para o grupo com *C. glabrata*, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Esses dados concordam com Takakura et al. (2003), que utilizando o mesmo modelo de candidose experimental desse estudo, recuperaram  $5,70 \log_{10}$  de *C. albicans* após 3 dias de inoculação. Costa et al. (2012) também encontraram  $5,77 \log_{10}$  de leveduras viáveis de *C. albicans* após 4 dias de inoculação nos camundongos

imunossuprimidos utilizando a mesma metodologia do presente estudo. Este é o primeiro estudo na literatura com o desenvolvimento de candidose bucal por *C. krusei* e *C. glabrata* em modelo de camundongo imunossuprimido. Até o momento, existe apenas o estudo de Yoshioka et al. (2012) que tentou induzir candidose bucal com uma espécie não-*albicans*, *C. dubliniensis*, porém não obteve êxito devido a menor patogenicidade das espécies não-*albicans*.

A grande quantidade de leveduras obtidas na recuperação deve ter ocorrido devido à sedação dos animais com clorpromazina durante a inoculação de *Candida*, o que manteve a suspensão na cavidade bucal dos animais por mais tempo já que a salivagem e a deglutição ficaram diminuídas. Segundo Wellmer e Bernhardt (1997), *Candida* em contato com as células do epitélio bucal começam a formar tubos germinativos após 30 min, o qual é importante fator de virulência para aderência, e a formação de hifas se estende após 90 min. Além disso, foi utilizado um imunossupressor e a administração diária de tetraciclina na água dos animais favorecendo a colonização e crescimento de *Candida* na língua dos camundongos.

O presente estudo mostra que *C. krusei* apresentou maior capacidade em colonizar a cavidade bucal dos camundongos imunossuprimidos do que a espécie *C. albicans*. A capacidade de crescimento e colonização de espécies não-*albicans* foi estudada em modelo murino de candidose gastrointestinal por Mellado et al. (2000) que demonstraram que *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentaram menor virulência em comparação com *C. albicans*, no entanto a colonização das duas espécies foi bem sucedida causando infecção persistente do trato gastrointestinal.

O menor valor de UFC/mL na recuperação da cavidade bucal dos animais foi para a espécie *C. glabrata*, sugerindo uma menor capacidade de colonização e infecção de *C. glabrata* em relação às demais espécies nesse modelo de candidose. Em contrapartida, Pereira-

Cenci et al. (2008) estudaram a formação *in vitro* de biofilme entre *C. albicans* e *C. glabrata* em corpos de prova confeccionados com hidroxiapatita, polimetilmetacrilato e resina para reembasamento utilizado na confecção de prótese total. Foram realizados ensaios com *C. glabrata* associada com *C. albicans* e com as espécies isoladamente. Após a formação dos biofilmes, esses foram quantificados pela contagem UFC/mL e foi obtido maior crescimento de *C. glabrata* comparado com *C. albicans* em todas as condições experimentais ( $p < 0,05$ ).

Na literatura não há estudos em camundongos com esse modelo de candidose bucal para *C. glabrata* e as diferenças de resultado entre estudos *in vitro* e *in vivo* pode ser devido ao tipo de cepa (padrão ou selvagem), aos fatores de virulência do micro-organismo, bem como as características fenotípicas, pois diferente das outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* não é dimórfica, sendo encontrada na forma de blastoconídeos tanto em condições de comensalismo quanto em situações de patogenicidade (Fidel et al. 1999). Isso pode ter dificultado sua capacidade de causar colonização e infecção nos animais já que a formação de hifas contribui na fixação e penetração do micro-organismo ao tecido possibilitando a disseminação do patógeno. A adesão de micro-organismos às superfícies mucosas do hospedeiro é um pré-requisito importante para a colonização microbiana e sofre influência a alguns fatores do próprio hospedeiro como o sistema imunológico, fluxo salivar e alimentação.

Silva et al. (2011a) estudaram a colonização e invasão de *C. albicans* e *C. glabrata* em células epiteliais bucais. A invasão epitelial foi mensurada por microscopia confocal laser e o dano epitelial pela mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH). Nos ensaios com *C. glabrata*, essa espécie foi capaz apenas de colonizar o epitélio, porém não conseguiu invadi-lo, o que contrasta com a extensa invasão e dano tecidual demonstrado pelo grupo de *C. albicans*.

Analisando o perfil de colonização de *C. albicans* em infecção monoespécie e multiespécie, verificou-se que a contagem de UFC/mL foi significativamente menor em ambas as infecções multiespécies, com 5,32 log<sub>10</sub> em associação com *C. krusei* e 5,46 log<sub>10</sub> com *C. glabrata* em relação à infecção monoespécie (5,75 log<sub>10</sub>). As espécies não-*albicans* apresentaram o mesmo perfil de colonização, para *C. krusei* foi observado crescimento de 6,18 log<sub>10</sub> na infecção monoespécie e 5,71 log<sub>10</sub> na infecção multiespécie. Já para a espécie *C. glabrata* foi recuperado 4,33 log<sub>10</sub> na infecção monoespécie e 3,85 log<sub>10</sub> na multiespécie. De acordo com os resultados apresentados, podemos verificar que nas associações com *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* apresentaram um menor crescimento na interação quando comparadas com o grupo controle, sugerindo que entre as espécies há uma relação de competição. Esses dados concordam com estudos *in vitro* de Thein et al. (2007), Korres et al. (2011), Piva (2012) que foram citados anteriormente, porém até o momento este é o primeiro estudo *in vivo* sobre a interação entre essas espécies.

A associação de *C. albicans* com *C. glabrata* foi estudada por Pathak et al. (2012) e Piva (2012) que avaliaram *in vitro* a interação entre essas espécies e encontraram uma relação favorável entre ambas, já Silva et al. (2013) que compararam a formação de biofilme *in vitro* por *C. glabrata* e *C. albicans*, individualmente ou em associação e, em seguida, examinaram os efeitos antimicrobianos das nanopartículas de prata e nistatina sobre os biofilmes formados após 24 h, concluíram que *C. glabrata* e *C. albicans* possuem uma relação neutra em biofilmes, sem aparente cooperação entre as espécies, e as nanopartículas de prata e a nistatina foram efetivas na redução dos biofilmes mistos formados pela associação dessas espécies. Segundo Li et al. (2007), pouco é conhecido sobre a virulência de *C. glabrata* e sobre as defesas do hospedeiro dirigidas contra esse micro-organismo. Assim, estudos *in vivo* para

compreender a patogênese de infecções por *C. glabrata* e suas interações com outras espécies são extremamente necessários.

As línguas dos camundongos em todos os grupos inoculados com suspensões de *C. albicans* exibiram lesões macroscópicas características de candidose sobre o dorso da língua, como presença de regiões esbranquiçadas com áreas de atrofia papilar localizadas principalmente na região das papilas cônicas simples. O valor da mediana de escore para o grupo monotípico de *C. albicans* foi maior que os grupos com infecções mistas com espécies não *albicans*, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Estudos utilizando a mesma metodologia do presente trabalho também observaram lesões características de candidose pseudomembranosa no dorso da língua dos camundongos (Hisajima et al., 2008; Mima et al., 2010; Costa et al., 2012; Kanaguchi et al., 2012; Ninomiya et al., 2012; Okada et al., 2013; Dovigo et al., 2013), entretanto, todos estes autores utilizaram somente *C. albicans* nos ensaios experimentais.

Já para os grupos monotípicos de *C. krusei* e *C. glabrata*, não foram observadas lesões características de candidose no dorso da língua dos animais, sugerindo que essas espécies emergentes foram capazes apenas de colonizar a cavidade bucal dos camundongos. Esses dados concordam com Westwater et al. (2007) que estudaram o tropismo de *C. glabrata* na mucosa gástrica e na bucal de camundongos germ-free num período de até 5 semanas após a inoculação de *Candida*. Os autores verificaram que *C. glabrata* foi capaz de aderir, colonizar e penetrar nos tecidos gástricos queratinizados, entretanto não foi observado colonização e infecção nos tecidos bucais (língua, palato e esôfago) por essa espécie. A razão para esta diferença de tropismo entre os tecidos é desconhecido no momento, *C. glabrata* pode exigir algumas bactérias comensais como receptores para adesão inicial nos tecidos ou algumas adesinas específicas para tecidos bucais podem estar ausentes nesta espécie.

Na análise microscópica foram encontradas muitas leveduras e hifas no dorso da língua dos animais e numerosas lesões epiteliais, principalmente nos grupos inoculados com *C. albicans*. Foi observado infiltrado inflamatório leve na maioria dos cortes histológicos com a presença de polimorfonucleares e mononucleares. Também foram observados microabscessos intraepiteliais subjacentes às leveduras e hifas localizadas na camada queratinizada, a presença dessas células inflamatórias pode ser devido aos efeitos mediados pela secreção de enzimas extracelulares, como a proteinase e fosfolipase, por *C. albicans* (Samaranayake Y, Samaranayake L, 2001). Estudos utilizando a mesma metodologia do presente trabalho também observaram lesões macroscópicas e histológicas características de candidose pseudomembranosa no dorso da língua dos camundongos (Hisajima et al., 2008; Mima et al., 2010; Costa et al., 2012; Kanaguchi et al., 2012; Ninomiya et al., 2012; Okada et al., 2013; Dovigo et al., 2013).

Segundo Costa et al. (2013) é evidente que a maioria dos estudos de candidose bucal em camundongos foram realizados com *C. albicans*. No entanto, com o aparecimento de infecções por espécies não-*albicans*, futuros estudos devem ser realizados para investigar a interação de infecções mistas por *Candida* na cavidade bucal e sua relação com episódios recorrentes de candidose bucal nos pacientes imunodebilitados. Os dois modelos hospedeiros estudados nesse trabalho foram essenciais para aumentar a nossa compreensão da patogenicidade de *Candida*, uma vez que as características dessa levedura e as respostas do hospedeiro são expressas no desenvolvimento da doença clínica. Entretanto, novos estudos são necessários para avaliar as alterações moleculares e a dinâmica da resposta imunológica na interação entre *C. albicans* e as diferentes espécies não-*albicans* visando uma maior compreensão da doença humana e o estabelecimento de novas terapias para as lesões de candidose.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos concluiu-se que:

- a) Na contagem de UFC/mL dos biofilmes formados *in vitro*, observou-se que o crescimento de *C. albicans* foi menor nos biofilmes heterotípicos em relação ao biofilme monotípico;
- b) Nas infecções mistas em *G. mellonella*, a presença de espécies não-*albicans* diminuiu o número de *C. albicans* na hemolinfa das lagartas e aumentou a sobrevivência desses animais;
- c) A candidose bucal experimental em camundongos imunossuprimidos foi menor nas infecções mistas em relação à infecção monoespécie por *C. albicans*;
- d) Em todos os modelos estudados, verificou-se que a infecção monotípica por *C. albicans* foi mais intensa do que as infecções mistas com espécies não-*albicans*, sugerindo uma relação ecológica de competição entre as espécies durante o estabelecimento da infecção.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002;78(922):455-9.

Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA, et al. Oral *lichen planus* and oral lichenoid lesions, diagnostic and therapeutic considerations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103 Suppl:S25 e11-12.

Allen CM, Beck FM, Lurie FA, Pinsky HM. Role of tetracycline in pathogenesis of chronic candidiasis of rat tongues. Infect Immun. 1985; 47(2):480-3.

Anaissie E, Hachem R, K-Tin-U C, Stephens LC, Bodey GP. Experimental hematogenous candidiasis caused by *Candida krusei* and *Candida albicans*: species differences in pathogenicity. Infect Immun. 1993;61(4):1268-71.

Badiee P, Alborzi A, Davarpanah MA, Shakiba E. Distributions and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patients. Arch Iran Med. 2010;13:282-7.

Bandara HM, Yau JY, Watt RM, Jin LJ, Samaranayake LP. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits *in-vitro* *Candida* biofilm development. BMC Microbiol. 2010;10:125.

Banville N, Browne N, Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. Virulence. 2012;3(6):497-503.

---

\*Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Borman AM, Szekely A, Linton CJ, Palmer MD, Brown P, Johnson EM. Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom. *J Clin Microbiol*. 2013;51(3):967-72.

Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;34(2):153-7.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2001;9(7):327-35.

Chamilos G, Lewis RE, Hu J, Xiao L, Zal T, Gilliet M, et al. *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:9367–72.

Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(1):42-55.

Chaurasia B, Pandey A, Palni LM, Trivedi P, Kumar B, Colvin N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiol Res*. 2005;160(1):75-81.

Chibebe Junior J, Fuchs BB, Sabino CP, Junqueira JC, Jorge AO, Ribeiro MS, et al. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. *PLoS One*. 2013;8(2):e55926.

Clancy CJ, Cheng S, Nguyen MH. Animal models of candidiasis. *Methods Mol Biol*. 2009;499:65-76.

Costa AC, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence*. 2013;4(5):391-9.

Costa AC, Rasteiro VM, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses*. 2012a;55(1):56-63.

Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araújo CF, Pereira CA, Junqueira JC, et al. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012b;114(1):67-74.

Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;27:163–9.

Cowen LE, Singh SD, Köhler JR, Collins C, Zaas AK, Schell WA, et al. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(8):2818-23.

De Repentigny L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7:324-9.

Desbois AP, Coote PJ. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an *in vivo* model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:1785–90.

Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol*. 2013;51(3):243-51.

Egusa H, Soysa NS, Ellepola AN, Yatani H, Samaranayake LP. Oral candidosis in HIV-infected patients. *Curr HIV Res*. 2008;6:485-99.

Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*. 2012. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x.

Evans SE, Leventakos K, Ben-Ami R, You D, Thakkar SG, Lewis RE, et al. *Toll*-deficient *Drosophila* are resistant to infection by *Pneumocystis* spp: additional evidence of specificity to mammalian hosts. *Virulence*. 2010;1:523–5.

Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):80-96.

Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect.* 2010;12:488–96.

Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, López-Rojas R, Pachón J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect Immun.* 2012;80:1015–24.

Gaitán-Cepeda LA, Martínez-González M, Ceballos-Salobreña A. Oral candidosis as a clinical marker of immune failure in patients with HIV/AIDS on HAART. *AIDS Patient Care STDs.* 2005;19(2):70-7.

Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin microbial Rev.* 2000;13:122-43.

Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* 2010;6(1):e1000713.

Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res.* 1997;11(1):160-7.

Giri S, Kindo AJ. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J Med Microbiol.* 2012;30(3):270-8.

Hamza OJ, Matee MI, Moshi MJ, Simon EN, Mugusi F, Mikx FH, et al. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. *BMC Microbiol.* 2008;8:135.

Hayama K, Ishibashi H, Kitadate K, Yamazaki M, Abe S. Therapeutic effect of oligonol, a low-molecular polyphenol formulation derived from lychee fruits on murine oral candidiasis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2010;51(3):137-42.

Herrero de Dios C, Román E, Diez C, Alonso-Monge R, Pla J. The transmembrane protein Opy2 mediates activation of the Cek1 MAP kinase in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.* 2013;50:21-32.

Hisajima T, Ishibashi H, Yamada T, Nishiyama Y, Yamaguchi H, Funakoshi K, et al. Invasion process of *Candida albicans* to tongue surface in early stages of experimental murine oral candidiasis. *Med Mycol.* 2008;46(7):697-704.

Höfling JF, Mardegan RC, Anibal PC, Furletti VF, Foglio MA. Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. *Mycopathologia*. 2011;172(2):117-24.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiol*. 2001;147:1997-2005.

Ishibashi H, Hisajima T, Hu W, Yamaguchi H, Nishiyama Y, Abe S. A murine model of esophageal candidiasis with local characteristic symptoms. *Microbiol Immunol*. 2007;51(5):501-6.

Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 2005;13(12):589-95.

Jorge AOC, Totti MAG, Almeida OP, Scully C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat. *J Oral Pathol Med*. 1993a;22(2):52-6.

Jorge AOC, Totti MAG, Almeida OP, Scully C. Effect of sialoadenectomised on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. *J Oral Pathol Med*. 1993b;22(3):138-40.

Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence*. 2012a;3(6):474-6.

Junqueira JC. Models hosts for the study of oral candidiasis. *Adv Exp Med Biol*. 2012b;710:95-05.

Junqueira JC, Colombo CED, Martins JS, Koga-Ito CY, Carvalho YR, Jorge AOC. Experimental candidosis and recovery of *Candida albicans* from the oral cavity of ovariectomized rats. *Microbiol Immunol*. 2005;49(3):199-207.

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SF, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar *in vitro* biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol*. 2011;11:247.

Junqueira JC, Vilela SF, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa AC, Rasteiro VM, et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012c;54(1):17-24.

Kamagata-Kiyoura Y, Abe S, Yamaguchi H, Nitta T. Protective effects of human saliva on experimental murine oral candidiasis. *J Infect Chemother*. 2004;10(4):253-5.

Kanaguchi N, Narisawa N, Ito T, Kinoshita Y, Kusumoto Y, Shinozuka O, et al. Effects of salivary protein flow and indigenous microorganisms on initial colonization of *Candida albicans* in an *in vivo* model. *BMC Oral Health*. 2012;12:36.

Kim CH, Shin YP, Noh MY, Jo YH, Han YS, Seong YS, et al. An insect multiligand recognition protein functions as an opsonin for the phagocytosis of microorganisms. *J Biol Chem*. 2010;285(33):25243-50.

Kirkpatrick WR, Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Patterson TF. Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. *J Clin Microbiol*. 2000;38:902-4.

Koga-Ito CY, Komiyama EY, Martins CA, Vasconcellos TC, Jorge AO, Carvalho YR, do Prado RF, Balducci I. Experimental systemic virulence of oral *Candida dubliniensis* isolates in comparison with *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *Mycoses*. 2011;54(5):e278-85.

Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. *In vivo* killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine Blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(3):932-40.

Korres AM, Buss DS, Ventura JA, Fernandes PM. *Candida krusei* and *Kloeckera apis* inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, *Fusarium guttiforme*. *Fungal Biol*. 2011;115(12):1251-8.

Kourkoumpetis T, Manolakaki D, Velmahos G, Chang Y, Alam HB, De Moya MM, et al. *Candida* infection and colonization among non-trauma emergency surgery patients. *Virulence*. 2010;1(5):359-66.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86:973-83.

Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med*. 2009;37(5):1612-8.

Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res*. 2007;86(3):204-15.

Lin JN, Lin CC, Lai CH, Yang YL, Chen HT, Weng HC, et al. Predisposing factors for oropharyngeal colonization of yeasts in human immunodeficiency virus-infected patients: a prospective cross-sectional study. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(2):129-35.

Lionakis MS, Lewis RE, May GS, Wiederhold NP, Albert ND, Halder G, et al. Toll-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. *J Infect Dis*. 2005;191:1188-95.

Luque AG, Biasoli MS, Tosello ME, Binolfi A, Lupo S, Magaró HM. Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. *Mycoses*. 2009;52(1):53-9.

Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA. Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(1):161-6.

Malani A, Hmoud J, Chiu L, Carver PL, Bielaczyc A, Kauffman CA. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. *Clin Infect Dis*. 2005;41(7):975-81.

Maninder J, Usha A. Isolation, characterization and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species causing oropharyngeal candidiasis in HIV positive patients *J Commun Dis*. 2008;40(3):177-81.

Marquina D, Santos A, Peinado JM. Biology of killer yeasts. *Int Microbiol*. 2002; 5(2):65-71.

Martinez LR, Fries BC. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. *Curr Fungal Infect Rep*. 2010;4(4):266-75.

Martins JS, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CED, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111(1):71-7.

Mellado E, Cuenca-Estrella M, Regadera J, González M, Díaz-Guerra TM, Rodríguez-Tudela JL. Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;38(1):21-8.

Mesa-Arango AC, Forastiero A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M, Mellado E, Zaragoza O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol*. 2013;51(5):461-72.

Michaux C, Sanguinetti M, Reffuveille F, Auffray Y, Posteraro B, Gilmore MS, et al. SlyA is a transcriptional regulator involved in the virulence of *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*. 2011;79:2638–45.

Mima EGO, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CAS, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(3):392-401.

Mitri S, Xavier JB, Foster KR. Social evolution in multispecies biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 2:10839-46.

Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, Drenkard E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun*. 2003;71:2404–13.

Mosci P, Pericolini E, Gabrielli E, Kenno S, Perito S, Bistoni F, et al. A novel bioluminescence mouse model for monitoring oropharyngeal candidiasis in mice. *Virulence*. 2013;4(3):250-4.

Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia*. 2008;165:1-3.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun*. 2005;73:3842–50.

Nace HL, Horn D, Neofytos D. Epidemiology and outcome of multiple-species candidemia at a tertiary care center between 2004 and 2007. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64(3):289-94.

Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*. 2004;6(10):915-26.

Navarro-Velasco GY, Prados-Rosales RC, Ortíz-Urquiza A, Quesada-Moraga E, Di Pietro A. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol*. 2011;48(12):1124-9.

Ninomiya K, Maruyama N, Inoue S, Ishibashi H, Takizawa T, Oshima H, et al. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis Biol Pharm Bull. 2012;35(6):861-5.

Noumi E, Snoussi M, Hentati H, Mahdouani K, del Castillo L, Valentin E, et al. Adhesive properties and hydrolytic enzymes of oral *Candida albicans* strains. Mycopathologia. 2010;169:269-78.

Okada M, Hisajima T, Ishibashi H, Miyasaka T, Abe S, Satoh T. Pathological analysis of the *Candida albicans*-infected tongue tissues of a murine oral candidiasis model in the early infection stage. Arch Oral Biol. 2013;58(4):444-50.

Pathak AK, Sharma S, Shrivastva P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. J Appl Oral Sci. 2012;20(1):70-5.

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. Nat Rev Microbiol. 2010;8(5):340-9.

Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. Arch Oral Biol. 2008;53(8):755-64.

Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. Clin Microbiol Rev. 2012;25(1):193-13.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20(1):133-63.

Piva E. Biofilmes heterotípicos formados por *C. albicans* e espécies não *albicans*: Estudo da interação microbiana e da sensibilidade à terapia fotodinâmica [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP; 2012.

Pomarico L, Cerqueira DF, de Araujo Soares RM, de Souza IP, de Araujo Castro GF, Socransky S, et al. Associations among the use of highly active antiretroviral therapy, oral candidiasis, oral *Candida* species and salivary immunoglobulin A in HIV-infected children. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108(2):203-10.

Ramage G, Mowat E, Jones B, Willians C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol*. 2009;35(4):340-55.

Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis- Clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol*. 2011;37(4):328-36.

Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, Santos JD, Jorge AOC, Junqueira JC. Correlation of phospholipase and proteinase production of *Candida* with *in vivo* pathogenicity in *Galleria mellonella*. *Braz J Oral Sci*. 2013;12(3):199-204.

Rowan R, Moran C, McCann M, Kavanagh K. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the *in vivo* anti-fungal activity of [Ag<sub>2</sub>(mal)(phen)<sub>3</sub>]. *Biomaterials*. 2009;22(3):461-7.

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(2):e139-43.

Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol 2000*. 2009;49:39-59.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol*. 1994;41(5):295-10.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):398-429.

Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast *in vitro* susceptibility profile. *PLoS One*. 2013;8(3):e60047.

Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2009;2260-9.

Shen S, Samaranayake LP, Yip HK. Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. *Arch Oral Biol*. 2005;50(1):23-32.

Silva S, Henriques M, Hayes A, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW. *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an *in vitro* oral epithelium. *J Oral Pathol Med*. 2011a;40(5):421-7.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. Trends Microbiol. 2011b;19(5):241-7.

Silva S, Pires P, Monteiro DR, Negri M, Gorup LF, Camargo ER, et al. The effect of silver nanoparticles and nystatin on mixed biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans* on acrylic. Med Mycol. 2013;51(2):178-84.

Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AO. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. Lasers Med Sci. 2010;25(3):385-9.

Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola AN. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis a brief overview. Oral Dis. 2008;14(2):138-43.

Starmer WT, Ganter PF, Aberdeen V. Geographic distribution and genetics of killer phenotypes for the yeast *Pichia kluyveri* across the United States. Appl Environ Microbiol. 1992;58(3):990-7.

Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. Infect Immun. 2004;72:3478-88.

Taguchi Y, Hayama K, Okada M, Sagawa T, Arai R, Abe S. Therapeutic effects of cinnamaldehyde and potentiation of its efficacy in combination with methylcellulose on murine oral candidiasis. Med Mycol J. 2011; 52(2):145-52.

Taguchi Y, Takizawa T, Ishibashi H, Sagawa T, Arai R, Inoue S, et al. Therapeutic effects on murine oral candidiasis by oral administration of Cassia (*Cinnamomum cassia*) preparation. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2010;51(1):13-21.

Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. Microbiol Immunol. 2003;47(5):321-6.

Tanaka H, Suzuki H, Nakahata T, Tateyama T, Sugimoto K, Ito E. Disseminated candidiasis following prednisolone therapy in systemic lupus erythematosus. Pediatr Int. 2002;44(6):702-4.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol*. 2007;52(12):1200-8.

Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses*. 2009;52(6):467-75.

Thompson GR3rd, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109:488-95.

Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*. 2012;55(3):199-204.

Totti MAG, Santos EB, Almeida OP, Jorge AOC. Implantation and permanency of *Candida albicans* in the oral cavity of normal sialodenectomized mice after a single inoculation of yeast. *Braz J Oral Sci*. 2002;1(3):133-6.

Van Merode AEJ, Pothoven DC, van der Mei HC, Busscher HJ, Krom BP. Surface charge influences enterococcal prevalence in mixed-species biofilms. *J Appl Microbiol*. 2007;102(6):1254-60.

Vazquez JA. Invasive fungal infections in the intensive care unit. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010;31(1):79-86.

Vogel H, Altincicek B, Glöckner G, Vilcinskis A. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC Genomics*. 2011;12:308.

Wellmer A, Bernhardt H. Adherence on buccal epithelial cells and germ tube formation in the continuous flow culture of clinical *Candida albicans* isolates. *Mycoses*. 1997;40(9-10):363-8.

Westwater C, Schofield DA, Nicholas PJ, Paulling EE, Balish E. *Candida glabrata* and *Candida albicans*; dissimilar tissue tropism and infectivity in a gnotobiotic model of mucosal candidiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;51(1):134-9.

Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol*. 2011;3. doi: 10.3402/jom.v3i0.5771.

Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. J Med Microbiol. 1996; 44(4):311-6.

Yoshioka H, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Mataga I. Virulence of *Candida dubliniensis* using a murine experimental oral candidiasis model in comparison with *Candida albicans*. Med Mycol J. 2012;53(2):135-45.

Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. Med Mycol. 2011;49(2):208-11.

**ANEXO - Certificado do Comitê de Ética em pesquisa envolvendo animais**

---

**unesp**  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**  
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Diniz **FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
CEP 13201-970 - F. (12) 3947-9028  
Fax (12) 3947-9010 / yamini@fodjce.unesp.br

---



**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **14/2011-PA/CEP**, sobre “**Interações entre diferentes espécies de Candida na candidose experimental em modelos de invertebrados e vertebrados**, sob a responsabilidade de **JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA**, tendo como orientado o aluno **RODNEI DENNIS ROSSONI**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por este Comitê de Ética.

São José dos Campos, 09 de dezembro de 2011.

---

**Prof.Assist.Dr. RUBENS NISIE TANGO**  
Coordenador